

Aus dem
Department für Frauengesundheit Tübingen
Universitäts-Frauenklinik

**Dosisgrenzen und molekulare Wirkmechanismen von
Plasmatherapien auf Endometriosegewebe**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Scheid, Juliane

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Weiss

2. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Avci-Adali

Tag der Disputation: 09.12.2024

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1. Endometriose.....	1
1.1.1. Ätiologie.....	2
1.1.2. Endometriose spezifische Veränderungen	3
1.1.3. Therapieansätze	6
1.2. Physikalische Plasmatherapie	7
1.2.1. Nichtinvasives physikalisches Plasma.....	7
1.2.2. Plasma aktiviertes Medium (PAM)	9
1.2.3. Anwendung und Wirkungsweisen	9
1.3. Wahl des Organoidmodells.....	10
1.4. Zielsetzung der Arbeit	12
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. Material.....	14
2.1.1. Reagenzien	14
2.1.2. Equipment	16
2.1.3. Zelllinien	18
2.1.4. Zellkulturmedium für die Organoide	18
2.1.5. Antigen Retrieval Puffer	19
2.1.6. Antikörper	20
2.1.7. Erythrolyse Puffer	20
2.1.8. Einstellungen der Plasmageräte.....	21

2.2. Methoden	21
2.2.1. 2D Kultur der Zelllinien hESC, ISHIKAWA, HEC-1A.....	21
2.2.2. 2D Kultur Splitten.....	21
2.2.3. 2D Kultur auf Coverslips	22
2.2.4. Paraformaldehyd-Fixierung von 2D Zellen	22
2.2.5. Probengewinnung	22
2.2.6. Aufbereitung zu Organoiden und Kultur	25
2.2.7. Passagieren und Einfrieren der Organoide.....	26
2.2.8. Mikroskopische Dokumentation mit dem EVOS-Mikroskop	27
2.2.9. Paraformaldehyd-Fixation von Organoiden	27
2.2.10. Paraffin-Einbettung der Paraformaldehyd fixierten Organoide	28
2.2.11. Endparaffinierung der Paraffin-eingebetteten Organoidschnitte	28
2.2.12. Antigen-Retrieval der Endparaffinierten Organoidschnitte	29
2.2.13. Immunfluoreszenz Färbung bei Paraffin fixierten Organoiden und Paraformaldehyd-fixierten 2D Zellen	29
2.2.14. Mikroskopische Dokumentation der Immunfluoreszenz Färbung bei Organoiden und 2D Zellen	30
2.2.15. Plasmabehandlungen	31
2.2.16. <i>Crystal-Violet staining Assay</i> der Plasmabehandelten 2D-Zellen.....	32
2.2.17. <i>CellTiter-Glo Assay</i> der Plasmabehandelten 3D Zellen	32
2.2.18. <i>Luciferase Assay</i> zur Testung konditionierten Mediums	33
2.2.19. Auswertung <i>ImageJ</i>	34
2.2.20. Statistische Auswertung.....	34
3 ERGEBNISSE	35
3.1. Etablierung verschiedener Konditionen der Plasmaaktivierung bei 2D kultivierten Endometriumkarzinomzelllinien	35
3.2. Beurteilung PAM-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in Zelllinien	41
3.3. Optimierung des Kulturmediums für die aus Patientenproben gewonnenen Endometrioseorganoide	44
3.4. Effekte verschiedener PAM-Konditionen auf die aus Patientenproben gewonnenen Endometrioseorganoide	46

3.4.1. Patientenkollektiv	46
3.4.2. Untersuchung der Einflüsse auf das Organoidwachstum durch PAM	46
3.4.3. PAM-Effekte auf zelluläre Struktur- und Proliferationsmarker sowie DNA-Doppelstrangbrüche in primären Endometrioseorganoiden.....	50
3.5. Dosisabhängige PAM-Effekte auf Organoide aus Endometriumkarzinomzelllinien	52
4 DISKUSSION	57
4.1. Methodik.....	57
4.1.1. PAM-Generierung	57
4.1.2. Medium.....	60
4.2. Übertragbarkeit der PAM-Konditionen von 2D auf 3D.....	61
4.3. Ausbleibende Wirkung von PAM auf Endometrioseorganoide.....	63
4.3.1. Evaluation der Limitationen indirekter NIPP-Therapie von Endometriose	63
4.3.2. Zelltyp- und Dignitäts-spezifische Selektivität von NIPP	67
4.4. Weiterzuführende Schritte	68
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	70
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	72
7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	85
8 ERGÄNZENDE ABBILDUNGEN.....	86

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

ABBILDUNG 1	24
ABBILDUNG 2	31
ABBILDUNG 3	37
ABBILDUNG 4	40
ABBILDUNG 5	43
ABBILDUNG 6	45
ABBILDUNG 7	49
ABBILDUNG 8	51
ABBILDUNG 9	53
ABBILDUNG 10.....	55
TABELLE 1	14
TABELLE 2	16
TABELLE 3	18
TABELLE 4	18
TABELLE 5	19
TABELLE 6	19
TABELLE 7	20
TABELLE 8	20
TABELLE 9	21
TABELLE 10	46
ERGÄNZENDE ABBILDUNG 1	86
ERGÄNZENDE ABBILDUNG 2.....	87

Abkürzungsverzeichnis

Östrogen Rezeptor: ER

Progesteron Rezeptor: PR

17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase: 17 β -HSD

Prostaglandin E2: PGE2

Tumor Nekrose Faktor: TNF

Cyclooxygenase-2: COX-2

Interleukin: IL

Paraformaldehyd: PFA

Dielectric Barrier Discharge: DBD

Atmospheric Pressure Plasma Jet: APPJ

Plasma aktiviertes Medium: PAM

Nicht invasives physikalisches Plasma: NIPP

Reaktive Sauerstoff Spezies: ROS

Reaktive Stickstoff Spezies: RNS

Multicellular tumor spheroids: MCTS

Sekunden: s

Minuten: min

Stunden: h

Millimeter: mm

Meter: m

Zentimeter: cm

Revolutions per minute: rpm

Phosphate buffered saline: PBS

Basement membrane extract: BME

Fetal bovine serum: FCS

P/S: Penicillin-Streptomycin

Raumtemperatur: RT

Standardmedium: SM

Optimiertes Medium: OM

1 Einleitung

1.1. Endometriose

Endometriose ist eine weit verbreitete, benigne und entzündliche gynäkologische Erkrankung, definiert durch das Vorkommen von Drüsen und Stroma des Endometriums außerhalb des Uterus (1-3). Man klassifiziert die Endometriose in drei Subtypen, die auf der Histopathologie und Anatomie basieren: die oberflächliche Endometriose, die tief infiltrierende Endometriose, welche eine Tiefe von über 5 mm überschreitet, und ovariale Endometriosezysten auch bezeichnet als Endometriome (4-6). Am häufigsten tritt die Endometriose am Ovar auf, kann jedoch auch als tief infiltrierende Endometriose die Blase (6,4 %) als sogenannte „anteriore Endometriose“ und als „posteriore Endometriose“ die uterosakralen Ligamente, den „Torus Uterinus“ (69,2 %), die Vagina (14,5 %) und den Darm (9,9 %) betreffen (6). Der „Torus Uterinus“ bezeichnet eine Verdickung, die die Insertion beider uterosakralen Bänder an der Hinterseite des Uterus bindet (7). Obgleich der Krankheitsverlauf auch asymptomatisch sein kann, leiden viele Betroffene je nach Lokalisation der Endometrioseherde an krampfartigen, oft zyklusassoziierten starken Schmerzen im Abdominalbereich und extremen Blutungen (3, 8). Die mit Endometriose assoziierte Subfertilität, die erkrankte Frauen im reproduktiven Alter ebenfalls betreffen kann, führt zu einer enormen Einschränkung der Lebensqualität der betroffenen Frauen (5, 9-12). Zusätzlich müssen sich Betroffene häufig Operationen aussetzen, da diese nach Versagen konventioneller Therapien häufig die letzte erfolgsversprechende Option darstellen (1, 4, 9).

Vor allem für Frauen mit tief infiltrierender Endometriose erfordert die operative Therapie aufwendige Resektionen des Gewebes im Becken (4).

Die Prävalenz von Endometriose liegt bei etwa 6-10% bei Frauen im reproduktiven Alter mit einer jährlichen Inzidenz von 2-7 Fällen aus 1000 Frauen. Jedoch befassen sich nur wenige Studien mit der Prävalenz und Inzidenz (13-15) und von einigen Autoren wird Endometriose auch als transientes Phänomen betrachtet (16, 17).

Eine deutlich erhöhte Prävalenz wurde bei Frauen beobachtet, die von Subfertilität (24-47%) (18) und chronischen Bauchschmerzen (71-87%) betroffen sind (9, 19).

1.1.1. Ätiologie

Die Ätiopathogenese der Endometriose ist bereits seit vielen Jahren Bestandteil der Forschung, doch bleiben die Ansätze bezüglich des Ursprungs- und Entstehungsmechanismus der Endometriose bislang überwiegend theoretisch (1). Viele Faktoren, die einen Einfluss auf die Ätiopathogenese der Endometriose haben, wurden bereits bestimmt. Neben anatomischen, hormonellen und immunologischen Faktoren spielen Genetik und Epigenetik ebenfalls eine Rolle (1, 2, 20-22).

Es wurden über die Jahre mehrere Theorien zur Entstehung der multifaktoriellen Erkrankung erhoben, wobei sich vor allem die „In Situ Theorie“ und die „Transplantationstheorie“ manifestiert haben (1).

Bei der „In Situ Theorie“ wird der Ursprung von Drüsen und Stroma bei Endometriose, die dem Endometrium gleichen, auf das lokal betroffene Gewebe zurückgeführt, welches sich dort durch Metaplasie zu dem für Endometriose charakteristischen Gewebe differenziert (23). Zusätzlich geht man von einem embryologischen Ursprung aus wie bei der Rückstände des Müller-Gangs Hypothese; engl. *Müllerian remnants hypothesis* (24). Hierbei besteht die Annahme, dass sich das Endometrium-ähnliche Gewebe durch Differenzierung und Proliferation aus embryologischen Zellrückständen entwickelt haben. Diese embryologischen Zellrückstände seien auf fehlplatzierte Zellen, die während der Einwanderung primitiven endometrischen Gewebes durch den Müller'schen Gang entstanden sind, zurückzuführen (25, 26). Ergänzend zu den bereits genannten Theorien gilt es die „Induktionstheorie“ zu erwähnen. Bezogen auf Modellstudien seien spezifische zellfreie endometrische Produkte dazu imstande, Metaplasie von undifferenzierten Mesenchymzellen hin zu endometrischen Stroma und Drüsen zu induzieren. Darauf beruhend wurde weiterführend angenommen, dass diese vom Endometrium des Uterus abgegebenen Substanzen sich ebenfalls lymphogen oder hämatogen im Körper

ausbreiten könnten, wodurch man ektopisches Endometrium in Organsystemen wie beispielsweise der Lunge und im Gehirn erklären könnte (27, 28).

Im Gegensatz zu der „In Situ Theorie“ basiert die „Transplantationstheorie“ darauf, dass die Drüsen und Stroma der Endometriose dem eutopischen Endometriumsgewebe entspringen (1).

Hierbei versteht man Endometriose als eine Art gutartige Metastase des eutopischen Endometriums, welche vom Uterus über unterschiedliche Wege wie beispielsweise hämatogen, lymphogen oder iatrogen zu anderen Lokalisationen des menschlichen Körpers gelangt (29).

Dazu gehörig und die am weitesten verbreitete Theorie ist die der retrograden Menstruation (30-32). Diese beinhaltet, dass die meisten Anteile der Endometriose und vor allem die der oberflächlichen peritonealen Endometriose durch den Reflux von eutopischen Endometriumfragmenten durch die Tuba uterina während der Menstruation stammen. Daraufhin komme es zur Implantation, Transition von Endometrium zu Endometriose sowie zum Wachstum auf und in das Peritoneum und Ovar. Die Theorie wurde durch die Tatsache plausibler, dass der Reflux von Gewebsfragmenten des Endometriums während der Menstruation bei Frauen im reproduktiven Alter weit verbreitet ist (5).

1.1.2. Endometriose spezifische Veränderungen

Endometriose geht mit einer hormonellen Dysregulation einher. Bei betroffenen Frauen wurden sowohl im ektopischen als auch im eutopischen Endometriumsgewebe erhöhte Östrogenspiegel festgestellt (1). Dies wird auf die Expression des Enzyms Aromatase P450 im Endometriosegewebe und Endometrium betroffener Frauen und die damit verbundene Bildung von Östrogenen und auf den fehlenden Schutzmechanismus vor erhöhten Östrogen Spiegeln aufgrund enzymatischer Inaktivität von 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 β -HSD) Typ 2 zurückgeführt (5, 33-36).

Die erhöhte Östrogen Produktion unterliegt zusätzlich einem positiven Feedback Mechanismus, indem Östrogen die Aktivität der Cyclooxygenase-2 verstärkt und

somit auch die Prostaglandin E2 (PGE2) Synthese. PGE2 besitzt wiederum eine stimulierende Wirkung auf die Aromatase P450 (37, 38).

Östrogen hat eine Schlüsselrolle beim Überleben und Wachstum der Endometriose, wobei Östrogenrezeptoren (ER) als Mediatoren dienen (1). Studien zeigten, dass die Entwicklung des Endometriosegewebes unterdrückt wurde, indem man ER-alpha und ER- β mit ER-selektiven Modulatoren hemmte (39-41).

ER- β steht mit mehreren Mechanismen im Zusammenhang, die zum einen vor Apoptose schützen und zum anderen das Überleben und Proliferation der Zellen sichern. Beispielsweise durch die Hemmung des durch Tumor Nekrose Faktor (TNF)-alpha induzierten Apoptose Signals, der Aktivierung *der nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFkB) Signalkaskade und Erhöhung der Expression von Interleukin-1 β (IL-1 β) (4, 41, 42). Die erhöhten ER- β Spiegel führen zusätzlich zu einer Herunterregulation der Expression von Progesteron-Rezeptoren (PR), da ER- β die Promotor Region für PR supprimiert (43).

Die verringerte Expression der PR führt im ektopischen Endometriosegewebe zu einer Progesteron Resistenz, welche sich ebenfalls auf die von Progesteron beeinflussten Gene auswirkt, zu denen auch das für 17 β -HSD Typ 2 codierende Gen gezählt wird (5, 44).

Dass Endometriose von lokalen Entzündungen und Immundysregulationen charakterisiert wird, gilt als gesichert, obgleich man diese bisher nicht sicher als Ursache oder Konsequenz der Erkrankung bestimmen konnte (3, 45, 46). Es wurde gezeigt, dass einige essentielle Entzündungsmediatoren wie Cyclooxygenase-2 (COX-2), IL-1 β , Interleukin-8 (IL-8), TNF-alpha und PGE2 in Endometriose Läsionen verglichen zum gesunden Endometrium erhöht sind (35, 37, 47-49). Diese Mediatoren erhalten durch synergistisches Arbeiten Entzündungen aufrecht und durch positives Feedback führt es zu einer persistierenden Entzündung, einer Dysregulation des Immunsystems, Angiogenese und dem Überleben des Endometriosegewebes (50-52).

Neben hormonellen, inflammatorischen und immunologischen Veränderungen bei Endometriose konnte aufgezeigt werden, dass es somatische Mutationen von

Krebs-assoziierten Genen in der tief infiltrierenden Endometriose (53), Endometriosezysten (54) und iatrogenen Endometriose (55) gibt. Laut Anglesio et al. (2017) enthielten 83 % der benignen Läsionen der tief infiltrierenden Endometriose somatische Mutationen und 26 % Krebs begünstigende Mutationen wie *Kirsten rat sarcoma virus* (KRAS), *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha* (PIK3CA), *AT-Rich Interaction Domain 1A* (ARID1A) und *Protein Phosphatase 2 Scaffold Subunit Alpha* (PPP2R1A). Diese gut erforschten Gene sind ebenfalls häufig im Endometriumkarzinom und mit Endometriose assoziiertem Ovarialkarzinom mutiert (53, 54, 56). Jedoch wurde bisher in den Endometriose Läsionen nie mehr als eine der Krebs begünstigende Mutationen gleichzeitig nachgewiesen (4) und eine maligne Transformation von Endometriose hin zum Karzinom wurde nach experimentellen Vergleichen zwischen KRAS-mutierter und Wild-Typ Endometriose Läsionen als sehr unwahrscheinlich eingestuft (57, 58).

Zusätzlich gibt es einige anders methylierte Gene, von denen angenommen wird, dass sie in der Entwicklung der Endometriose eine Rolle spielen. Veränderte Methylierung wurde bei den Promotern von *Estrogen Receptor 1* (ESR1), *Estrogen Receptor 2* (ESR2), *Progesterone Receptor* (PGR), *Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1* (NR5A1), *Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1* (CYP19A1), *Homöobox* (HOX) Gen Klustern festgestellt mit den entsprechenden Veränderungen im Gen und der Proteinexpression (59-62).

Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt der Endometriose spezifischen Veränderungen verglichen zu eutopischen Endometrium ist die Rolle des oxidativen Stresses. Dieser ist nachweislich in die Pathophysiologie der Endometriose involviert, indem dieser eine inflammatorische Reaktion in der Peritonealhöhle verursacht (63-65). Diese Reaktion wurde in *in-vivo* und *in-vitro* Studien von Lousse et. al 2012 so erklärt, dass es bei Frauen mit Endometriose durch Eisenüberladung zu einer Produktion von ROS kommt. Das verursacht einen Anstieg von NFκB in peritonealen Makrophagen, was verglichen zu gesunden Kontrollen proinflammatorisches Wachstum und angiogenetische Faktoren förderte (66). Wie in Tumorzellen wurde auch in Endometriosezellen beobachtet, dass diese höherem endogenen oxidativen Stress durch Anstieg der

ROS Produktion, Änderungen der antioxidativen Mechanismen und einem Abfall der Katalase Spiegel ausgesetzt sind (67).

Die bisherigen Erkenntnisse über die Endometriose spezifischen Veränderungen bieten Chancen für einen personalisierten Therapieansatz der Erkrankung und gleichzeitig sind noch weitere Nachforschungen bezüglich ihres Ursprungs und ihrer Pathomechanismen nötig, um dieses Krankheitsbild vollends zu verstehen.

1.1.3. Therapieansätze

Die derzeitigen Therapiemöglichkeiten der Endometriose bestehen hauptsächlich aus chirurgischer Resektion und hormoneller Therapie. Diese beinhalten jedoch Limitationen wie das Rezidivrisiko, Nebenwirkungen, Kontrazeption für Frauen mit Kinderwunsch und Kosten.

Momentan besteht die Strategie in der Behandlung Endometriose assoziierten Schmerzes darin, die Östrogen Produktion zu unterdrücken und eine Amenorrhö zu induzieren, um die Progression der Erkrankung zu verhindern (68). Jedoch handelt es sich dabei um ein rein suppressives Vorgehen und nicht um einen kurativen Ansatz. Nach der medikamentösen oder chirurgischen Behandlung besteht eine Rezidivrate von 21,5 % nach 2 Jahren und 40-50 % nach 5 Jahren (69). Die Rate an erneut notwendigen Operation stieg in einer siebenjährigen *Follow-up*-Studie mit voranschreitender Zeit kontinuierlich an (70).

Vor allem bei der Therapie von Endometriomen reicht die medikamentöse Therapie oft nicht aus, weshalb die laparoskopische Resektion anschließend erforderlich wird (71-73). Die chirurgische Resektion der Endometriome wirkt sich jedoch negativ auf die ovarielle Reserve der Betroffenen aus (74), wodurch dies ebenfalls nicht die optimale Therapieoption darstellt.

Auch bei der tief infiltrierenden Endometriose hat das Versagen der konservativen Therapie bestehend aus Hormonsuppression wie GnRH-Agonisten häufig eine chirurgische Resektion zur Folge, die bei dieser Form der Endometriose hoch invasiv und aufwendig ist (4, 75).

Über die genannten Behandlungsansätze hinaus gibt es bisher keinen weiteren kurativen Therapieansatz für die Endometriose. Die chirurgische Resektion bleibt nach wie vor der Goldstandard bei der Therapie. Vor allem die o.g. Rate an

Rezidiven und notwendige Folgeoperationen, welche die Patienten oftmals stark belasten (5, 11, 12), betonen die Notwendigkeit der Forschung und Entwicklung neuer Therapieansätze.

1.2. Physikalische Plasmatherapie

1.2.1. Nichtinvasives physikalisches Plasma

Die Applikation von Plasma hat in den letzten Jahren viel an wissenschaftlicher Aufmerksamkeit gewonnen und besitzt eine Fülle an potentiellen Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin und Biologie.

Nicht invasives physikalisches Plasma (NIPP) hat bereits vielversprechende anti-neoplastische Effekte bei gynäkologischen Tumoren, Tumoren des Pankreas und der Prostata, aber auch Melanomen und Gliomen gezeigt (76-81)

Physikalisches Plasma, auch als vierter Aggregatzustand bezeichnet, besteht aus einem chemisch-biologisch reaktiven Gas, welches sich aus Ionen, Elektronen, Radikale und Ultravioletter (UV) Strahlung zusammensetzt (82, 83). Nicht-thermisches physikalisches Plasma, zu dem auch NIPP gezählt wird, übersteigt Temperaturen von 40 °C nicht und vermittelt seine beschriebene antineoplastische, wundheilungsfördernde und prokoagulative Wirkung durch chemisch-molekulare Zelleffekte (84, 85).

Basierend auf unterschiedlichen Prinzipien der Plasmagenerierung wurden in dieser Arbeit zwei etablierte Gerätekonzepte verwendet - der *atmospheric pressure plasma jet* (APPJ) (86-88) und das Prinzip des *dielectric barrier discharge* (DBD) (89-91). Beim APPJ werden die aktiven Plasmaspezies durch einen Gasfluss vom Hauptentladungsbogen in Form eines Jets emittiert (92), wohingegen beim DBD die Plasmaentladung hin zu einer Negativelektrode erfolgt (91-93). Der Plasma Jet eignet sich für die präzise Behandlung kleiner Flächen auf einer Probe (92, 94-96). Das DBD hingegen wird zur Plasmabehandlung einer größeren Fläche oder Menge an Flüssigkeit bevorzugt, da die Behandlung mit diesem Gerät intensiver ist und größere Flächen gleichmäßig mit Plasma behandelt (92).

Die genauen biologischen Effekte des NIPP sind noch Gegenstand der Forschung, werden jedoch hauptsächlich auf die Generierung reaktiver

Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) bei der Interaktion des NIPP mit Gasen, Flüssigkeiten oder festen Stoffen zurückgeführt. Intrazellulär hat dies u.a. die Aktivierung anti-proliferativer Mechanismen in Krebszellen zur Folge (82, 85, 97-102). Relevante primär und sekundär entstehende reaktive Spezies sind beispielsweise Hydroxyl-Radikale (OH), Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Nitrit (NO₂⁻), Nitrat (NO₃⁻), Peroxynitrit (ONOO⁻) (103). Diese reaktiven Spezies verursachen ein Redox Ungleichgewicht, was zu einem erhöhten oxidativen Stress führt und mit der Beschädigung zellulärer Komponenten wie Lipiden, Proteinen und DNA einhergeht (97, 104). Davon sind z.T. selektiv karzinogene Zellen betroffen, was sich vermutlich auf eine schlechtere antioxidative Kapazität dieser zurückführen lässt (105, 106). Gleichzeitig wurde die selektive Wirkung der NIPP-Behandlung auch für unterschiedliche andere Zellentitäten nachgewiesen (107). Zudem wird angenommen, dass geringe Konzentrationen bei der Plasmabehandlung das Zellüberleben, Migration, Differenzierung und Proliferation fördern, wohin gegen bei höheren Konzentrationen Zellapoptose induziert wird (108).

Bisher wurden weder mutagene noch andere schwerwiegende Nebenwirkungen der NIPP-Behandlung nachgewiesen (99, 107).

Während bei der indirekten Plasmatherapie mit Plasma aktivierter Flüssigkeit vor allem langlebige reaktive Spezies wie Wasserstoffperoxid und Nitrat in Bezug auf biochemische Effekte von Bedeutung sind, spielen bei der direkten Plasmatherapie auch kurzlebige reaktive Spezies wie Hydroxyl-Radikale, welche nur für Nanosekunden stabil bleiben, oder Singulett-Sauerstoff, welcher bis zu einigen Mikrosekunden überlebt, eine Rolle. Deren Einfluss auf das biologische Gewebe oder Zellen erfolgt jedoch nur solange das physikalische Plasma appliziert wird (100, 109).

Gleichzeitig werden die Auswirkungen der reaktiven Spezies durch antioxidativ wirksame Stoffe beeinflusst. Das bedeutet, dass vor allem Stoffe wie Glutathion, N-Acetylcystein, Katalase und Superoxid-Dismutase bei Verwendung von Plasmatherapien zu berücksichtigen sind (110).

1.2.2. Plasma aktiviertes Medium (PAM)

Werden Flüssigkeiten mit NIPP behandelt, entsteht Plasma aktiviertes Medium (PAM), welches mit langlebigen RONS, die Lebensspannen von Stunden bis Tagen besitzen, angereichert wird (111). Bei der Applikation von PAM auf ein biologisches Ziel spricht man von indirekter Plasmatherapie (112-114).

Die Wirksamkeit des PAMs ist von Faktoren wie dem Trägergas, dem Abstand zwischen Plasmaquelle und Flüssigkeitsoberfläche, der verwendeten Flüssigkeit, der Dauer der Lagerung und der Temperatur, bei der es gelagert wird, abhängig (111).

Jedoch wurde gezeigt, dass die Applikation von PAM (z.B. auf Krebszellen *in-vitro*) ähnliche und spezifische Zelleffekte auslösen kann wie eine direkte Plasmabehandlung (100, 115-118). Vorteile der indirekten Plasmabehandlung können in der chemischen Stabilität von PAM sowie dessen einfache Anwendbarkeit in schwer zugänglichen Oberflächen und Körperhöhlen (wie bei laparoskopischen Eingriffen) liegen (101, 119). PAM führten i.R. von Injektionen in Tumore zur effizienten Remission (80, 120).

Im Hinblick auf eine klinische Anwendung bei Endometriose könnte PAM gegenüber der direkten NIPP Behandlung bezüglich einer möglichen Therapie der Endometriose mit Plasma zu bevorzugen sein, da dies im Rahmen einer Laparoskopie stattfinden würde und die Vorteile der indirekten Behandlung dabei überwiegen.

1.2.3. Anwendung und Wirkungsweisen

Die bisher bekannten biologischen NIPP Effekte beinhalten Zelltyp-spezifische Wachstumseinflüsse, positive Beeinflussung von Wundheilung und Narbenbildung, antimikrobielle und antivirale Wirksamkeit, Entzündungsmodulation und Apoptose (78, 79, 85, 100, 121-125).

Vor allem im Bereich der Dermatologie findet die antibakterielle und Wundheilung fördernde Wirkung des NIPP zur Verbesserung des Heilungsprozesses chronischer Ulcera nach Durchführung vieler Studien Anwendung (126-131). Auch im Bereich der Onkologie gibt es vielversprechende Studien bezüglich der

anti-proliferativen und apoptotischen Einflüsse von NIPP und PAM auf verschiedene Krebszellen (76, 85, 119, 132).

Die beschriebenen antiproliferativen NIPP und PAM-Effekte konnten außerdem bei Zellen gynäkologischer Tumore nachgewiesen werden wie beispielsweise für das Ovarialkarzinom (78, 120, 133, 134), das Zervixkarzinom (81) und das Mammakarzinom (135). Für die Vorstufen des Zervixkarzinoms CIN 1 und 2 wurden zusätzlich bereits erfolgreich *in-vivo* Studien mit NIPP durchgeführt (136). Bezüglich der Wirkung von NIPP und PAM auf Endometriose gibt es bisher wenige Studien. Ishida et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass Endometrioseläsionen verglichen zu den Kontrollen nach direkter 0,5-minütigen NIPP Exposition signifikant remissiv waren und weniger epitheliale proliferative Aktivität besaßen (137).

Weitere Studien mit Endometriose erfolgten mit thermischem Plasma in Form einer direkten Behandlung, wobei vor allem die thermischen Effekte eine Remission der Endometrioseläsionen zur Folge hatten (138, 139). Studien zur Behandlung von Endometriose mit durch NIPP generiertes PAM gibt es bis dato nur in Form von 2D-Zellmodellen (137).

1.3. Wahl des Organoidmodells

Endometrium und Endometriose stellen komplexe, vielzellige Gewebe bestehend aus glandulären und luminalen Epitelzellen, Stromazellen, Immunzellen und vaskulären Zellen dar (140-142).

Bisher gab es Limitationen bezüglich der Darstellung von Endometrium und Endometriose sowie Endometriumkarzinom, der häufigsten Malignität des weiblichen Genitaltraktes, in akkuraten *in-vitro*-Modellen (143-145). Nachdem es bereits als akkurates *in-vitro*-Modell für andere Gewebe etabliert wurde (146-150), wurden mit der Etablierung von Organoiden aus endometrioiden Primärzellen vielfältige Möglichkeiten zur Testung therapeutischer Konzepte eröffnet (151, 152). Aus *in-vivo*-Gewebe gewonnene Endometriumorganoide besitzen dieselbe molekulare Signatur wie die des patientenspezifischen Endometriums, können über mehrere Passagen über Monate kultiviert werden und behalten dabei genetische und phänotypische Stabilität (151, 152). Die aus

Endometriose gewonnenen Organoid replizieren die wichtigsten Eigenschaften des Ursprungsepithels, also die glandulären Epithelzellen des Endometriums, und sind ebenfalls für lange Kulturzeiträume bei genetischer und phänotypischer Stabilität geeignet (153). Außerdem wurde die Diversität der Erkrankung in den Endometrioseorganoiden ebenfalls widergespiegelt (151).

Verglichen mit anderen Modellen, durch welche man patientenspezifisches Endometrium unter *in-vitro* Bedingungen darzustellen versucht, stellt das Organoidmodell eine vielversprechende Möglichkeit zur Imitation des physiologischen *in-vivo* Mileus dar (143). Im Mausmodell beispielsweise kann die Spezifität der Entwicklung des menschlichen Endometriums nicht akkurat wiedergegeben werden. Die Dezidualisierung verläuft bei Menschen zyklisch, wohingegen sie bei Mäusen nur bei Einnistung des Embryos oder als Antwort auf mechanische Verletzungen stattfindet. Die komplette Übertragung der Resultate aus Mausversuchen auf Menschen gestaltet sich folglich schwierig (154, 155).

Ebenfalls etabliert ist die Verwendung von immortalisierten und aus Krebs-Zellen gewonnenen Zelllinien wie ISHIKAWA (epitheliale Endometriumzellen) und ST-T1b-Zellen (Endometriums Stromazellen). Diese lassen sich zwar leicht über einen langen Zeitraum kultivieren, besitzen jedoch generelle Limitationen (156). Ähnliches gilt bei primär isolierten Endometriumzellen, wobei diese mit konventionellen 2D-Zellkultursystemen schwer in eine langfristige Kultur zu überführen sind (156). Zell-Zell-Interaktionen, Zell-Extrazellulär-Matrix Interaktionen sind im 2D-Modell limitiert (143).

Nachteilig ist der Aufbau von Organoiden aus Einzelzellen. Es handelt sich daher i.d.R. um Konglomerate aus Zellklonen, die die physiologische, biochemische, biomechanische und multizelluläre Mikroumgebung des *in-vivo*-Gewebes nicht widergespiegelt.

Dennoch kann die Verwendung von Endometriumorganoiden aus primärem Patientengewebe vielversprechend für Studienmodelle, Medikamententests und die Entwicklung neuer Therapien sein (151). Besonders im Hinblick auf Endometriose ist die Verwendung des Organoidmodells eine Chance die komplexe Erkrankung besser untersuchen zu können (153).

Die Vorteile eines Endometrioseorganoidmodells ermöglichen eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse der Plasmatherapie *in-vitro* auf eine potentielle Behandlung der Erkrankung *in-vivo*. Im Hinblick auf die wenigen Daten bezüglich des Einflusses von NIPP und PAM auf Endometriose (137) sind die Untersuchungen dieser Forschungsarbeit ein wesentlicher Beitrag zur präklinischen Translation. Die meisten *in-vitro* stattgefundenen Studien bezüglich der Wirkungsweise von NIPP-Behandlungen wurden mit immortalisierten Zellen durchgeführt, welche die physiologische Komplexität des Epithels *in-vivo*, bestehend aus verschiedenen Zelltypen mit spezifischen Funktionen, nicht akkurat widerspiegeln (157). Einzelne Studien befassten sich bereits mit dem Einfluss von NIPP auf *multicellular tumor spheroids* (MCTS), wobei die abgeschwächten Effekte der Plasmabehandlung im 3D-Zellmodell verglichen zu 2D betont wurde (158-161). MCTS sind ein 3D-Zellmodell, bei dem Zellen hauptsächlich aus etablierten 2D-Tumorzelllinien in simpleren Klustern über Adhäsion und ohne Matrigel eine drei dimensionale Form bilden (162). Diese bilden die metabolischen und proliferativen Eigenschaften klinischer Tumore als auch mögliche Resistenzentwicklungen vergleichbar mit der *in-vivo* Situation ab (163, 164). Jedoch bestehen diese nicht wie Organoide aus Progenitor- und Stammzellen, die die Funktionalität und Architektur ihres Ursprungsgewebes abbilden können (165, 166).

In einer aktuellen Studie bezüglich der direkten NIPP- und PAM-Behandlung von Tumorzellen verglichen zu gesunden Zellen in intestinalen Organoiden gewonnen aus Mäusen, wurde eine unerwartete höhere Resistenz der Tumor Organoide verglichen zu normalen Organoiden festgestellt (167). Diese Resultate sprechen für die Notwendigkeit weiterführender Untersuchungen der Einflüsse von NIPP und PAM auf Organoide, da diese das *in-vivo* Gewebe besser imitieren und somit eine bessere Übertragung der Ergebnisse auf *in-vivo* möglich ist.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Der antiproliferative Einfluss von PAM auf das Wachstum von immortalisierten und in konventionellen 2D-Zellkultursystemen kultivierten Zelllinien wurde in

diversen Arbeiten gezeigt. Auch für Endometriosegewebe und die HEC-1A Zelllinie mit dem Ursprung aus epithelialen Endometriumkarzinomzellen wurden diese Effekte nachgewiesen (102, 137). Diese basieren auf direkter Plasma-Behandlung.

In der vorliegenden Arbeit sollen die in der Literatur gezeigten antiproliferativen Zelleffekte erstmals unter Verwendung einer DBD-Plasmaquelle (Plasma DBD GmbH) und Applikation mittels PAM dosisabhängig verifiziert und auf 3D Endometrioseorganoide übertragen werden, die aus primären Patientenproben gewonnenen werden. Im Fokus der Untersuchungen standen hierbei folgende Zielsetzungen:

- Charakterisierung antiproliferativer Plasmaeffekte und Einflüsse auf die DNA-Integrität unter Verwendung unterschiedlicher Parameter zur Plasmagenerierung und unterschiedlicher Medien für die PAM-Generierung in 2D-Zellkultursystemen.
- Validierung der antiproliferativen Plasmaeffekte und Einflüsse auf die DNA-Integrität unter Verwendung unterschiedlicher PAM-Inkubationszeiten und der Einflüsse von optimierten Organoidzellkulturmedien zur PAM-Generierung in 3D-Organoidsystemen.
- Validierung der antiproliferativen Plasmaeffekte und Einflüsse auf die DNA-Integrität sowie auf die Expression unterschiedlicher zellulärer Proliferationsmarker unter Verwendung optimierter PAM-Konditionen und Organoidzellkulturmedien zur PAM-Generierung in patientenspezifischen 3D-Endometrioseorganoidsystemen.
- Übertragung der optimierten PAM-Konditionen auf ein malignes 3D-Organoidsystem unter Verwendung von Endometriumkarzinomzelllinien.

2 Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Reagenzien

Tabelle 1

Experiment	Reagent	Größe	Firma	Produktnu.
Zellkultur (2D)	DMEM	500 mL	Gibco	41965-039
	<i>Fetal bovine serum</i>	500 mL	Gibco	10270-106
	<i>Dulbeccos Phosphate buffered Saline</i>	500 mL	Sigma	D8537
	Trypsin EDTA 0,05%	100 mL	Thermo Fisher Scientific	25300-054
Zellkultur (3D)	<i>Cultrex reduced growth factor BME2</i>	1 mL	Bio-Techne	3533-001-02
	<i>recovery cell culture freezing medium</i>	50 mL	Gibco	12648010
	TrypLE	100 mL	Gibco	12604013
Gewebeverarbeitung	Kollagenase (S)	100 mg	Sigma	C9407
	Kollagenase Typ II	1 g	Gibco	17101015
Medium	A83-01	10 mg	Tocris	2939
Bestandteile	<i>Advanced DMEM/ F12</i>	500 mL	Gibco	12634010
	<i>B27 supplement</i>	10 mL	Gibco	17504-44
	<i>B27 supplement - AO</i>	10 mL	Thermo Fisher Scientific	10889038
	EGF	1 mg	Peprotech	AF-100-15
	FGF-10	50 µg	Peprotech	100-26
	GlutaMax	100 mL	Gibco	35050-038

	HEPES	100 mL	Thermo Fisher Scientific	15630-056
	<i>N-Acetyl-L-cysteine</i>	5 g	Sigma	A9165-5G
	<i>Nicotinamide</i>	100 g	Sigma	NO636
	Penicillin - Streptomycin	100 mL	Gibco	15140-122
	SB202190	5 mg	Sigma	S7067
	Y-27632	50 mg	Hözel	TMO-T1725- 50 mg
Immunfluoreszenz	<i>Albumin from bovine serum</i>	100 g	Fluka BioChemika	05488
	DAPI 1000 X	1 mg/mL	Invitrogen	D1306
	ProLong™ Diamond Antifade Mountant mit DAPI	2 mL	Invitrogen	P36962
	Triton X-100	12 mL	SEKISUI	R14694
	Tween® 20	250 g	Roth	9127.1
Fixierung der Zellen/Organoide	Dispase II	1 g	Sigma	D4693
	Ethanol	2.5 L	Merck KGaA	1.00983.251 1
	Ethanol 99% denaturiert	5 L	Pharmacy	C1016
	37%-ige Formaldehyd- Lösung	1 L	Merck KGaA	1.04003.100 0
	<i>Sodium azide</i>	100 g	Merck	1.06688.010 0
	Xylol	2.5 L	PanReac AppliChem	131769.1612
Paraffin Einbettung	Histogel	10 mL	Fisher Scientific	12006679

	Paraplast Plus	1 kg	McCormick Scientific	39502004
Antigen Retrieval (HIER)	<i>Ethylenediamine-tetraacetic acid</i>	250 g	AppliChem	A5097,0250
	<i>Sodium hydroxide solution</i>	1 L	Merck KGaA	1.09137.1000
	<i>Tri-Sodium-Citrate</i>	1 kg	AppliChem	A3901,1000
	Trizma® base	1 kg	Sigma	T1503-1KG
Cell-Titer-Glo 3D Assay	CellTiterGlo	10mL	Promega	526140
Crystal Violet Staining Assay	Hexamethyl-pararosanilinchlorid	100 G	Sigma	C0775-100G
Argon Gas	99,998 Vol% Argon	50L	Westphalen	2760050288 7945-62

2.1.2. Equipment

Tabelle 2

Gerät	Typ	Firma
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heraeus
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge	Rotina 380	Hettich
EVOS Mikroskop	M7000	Invitrogen
Ikubator	9040-0012 CB 150	Binder
Varioskan LUX multimode microplate reader	VL0000D0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lichtmikroskop	CK 30	Olympus
Mikrotom	HM 335 S	Microm Cool-Cut
Zellkulturplatte	48-Well Platte	Falcon
Zellkulturplatte	96-Well Platte U-Form Boden	Falcon
Zellkulturplatte	96-Well Platte flacher Boden	Falcon

Zellkulturplatte	96-Well Platte flacher weißer Boden	Fisher Scientific Nunclon Delta Surface
Glas Slides	30000030	R. Langenbrinck GmbH
Coverslips	631-0169	VWR
T25 Flask	690175	Greiner Bio One
T75 Flask	658175	Greiner Bio One
Laminar flow	Herasafe	Heraeus
Thermomixer	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Zellzähler	TC20	Bio-Rad
Label Drucker	BMP*51	Brady
Skapell	3000093	Feather
Spitzenspitze	303174	BD
Zell Kühler	Cool Cell	Biocision
Cell strainer (100 µm)	542000	Greiner Bio One
Spritze	61345930	BD
Cryovial	122263	Greiner Bio One
Reaktions Falcon (0,5 mL)	S72699	Sarstedt
Reaktions Falcon (1,5 mL)	616201	Greiner Bio One
Canonical tube 15 mL	188271-N	Greiner Bio One
Canonical tube 50 mL	227261	Greiner Bio One
Pipetten Spitzen 0,1-10 µl	61305171	Sarstedt
Pipetten Spitzen 100 µl	61349913	Sarstedt
Pipetten Spitzen 1000 µl	61348261	Sarstedt
DBD Plasma Gerät	DBD <i>Liquid Treatment System</i>	FB: 8.35.6 Version: 01
Plasma Pen (APPJ)	<i>kINPen med</i>	Neoplas med
Petrischale (klein)	2.5 cm	Falcon
Petrischale (groß)	5 cm	Falcon
Schüttler für Platten	6 <i>plates</i>	Heidolph Instruments Titramax 1000
Wasserbad	37°C	GFL; Typ: 1003; no.:11233302 K

2.1.3. Zelllinien

Tabelle 3

Zelllinie	Lot. No	Medium	Zelltyp
HEC-1A	70004875	DMEM	Humane
		P/S +FBS	Endometriumkarzinomzellen
ISHIKAWA	99040201	DMEM	Humane
		P/S +FBS	Endometriumkarzinomzellen
hESC	70004235	DMEM	Humane
		P/S +FBS	Endometrium Stromazellen

2.1.4. Zellkulturmedium für die Organoide

Die L-WRN Zellen wurden aus L-Wnt3A (ATCC® CRL-2647) Zellen mit transfiziertem R-Spondin 3 und Noggin ko-exprimierten Vektor generiert. Das konditionierte Medium wurde durch die Nutzung der Zelllinie L-WRN, die ohne FCS für RN konditioniertes Medium kultiviert wurde, vorbereitet.

Der Hauptbestandteil des Standardmediums (SM) stellte Advanced DMEM⁺⁺⁺ (mit P/S, GlutaMax und HEPES) dar und für das optimierte Medium (OM) DMEM (mit P/S, GlutaMax). Sie wurden genutzt, um bis zu dem entsprechenden Volumen aufzufüllen.

Tabelle 4

Bestandteil	Finale Konzentration	SM	OM
RN mit adv.DMEM	10%	x	-
RN mit DMEM	10%	-	x
B27 (50x)	1x	x	-
B27 minus AO (50x)	1x	-	x
<i>Nicotinamide</i> (1 M)	10 mM	x	x
N-Acetylcystein (500 mM)	1.25 µM	x	-
FGF10 (20 µg/mL)	0.01 µg/mL	x	x
EGF (10 µg/mL)	5 µg/µL	x	x

A83-01 (5 mM)	0.5 μ M	x	x
SB202190 (5 mM)	0.5 μ M	x	x
Y27632 (100 mM)	5 μ M	x	x

- DMEM **: DMEM mit 1% Penicillin-Streptomycin und 1% GlutaMax
- *Advanced* DMEM ***: *Advanced* DMEM mit 1 % Penicillin-Streptomycin, 1% GlutaMax und 1% HEPES

2.1.5. Antigen Retrieval Puffer

Tabelle 5

- *Tri-Sodium-Citrate* Puffer, pH 6,0 (1 L)

Reagent	Menge
Tri-Sodium-Citrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	2,94 g
H ₂ O	auffüllen bis 900 mL
HCl (0,1 M)	wie benötigt, um pH 6.0 zu erhalten
H ₂ O	auffüllen bis 1 L
20 % Tween	2,5 mL

Tabelle 6

- *Tris-EDTA*, pH 9,0 (1 L)

Reagent	Menge
Tris Base	1,21 g
EDTA	0,37 g
H ₂ O	auffüllen bis 1 L
NaOH (1 M)	wie benötigt, um pH 9.0 zu erhalten
20 % Tween	2,5 mL

2.1.6. Antikörper

Tabelle 7

Name	Ziel	Spezies	Verdünnung (FFPE Objekträger)	Firma	Bestell nummer	pH / Puffer
Ki67	Ki67/ Mib1	Rabbit	1:500	Abcam	16667	pH 9
p53 (DO-1)	p53	Mouse	1:50	Santa Cruz	SC-126	pH 6
Pan- Cyto- keratin (C-11) - FITC	CK 4,5, 6,8,10,1 3,18	Mouse	1:250	Invitro gen	MA5- 28561	pH 6
PAX 8	PAX8	Rabbit	1:150	Protein tech	10336-1- AP	pH 9
yH2AX	Histone H2AX- Ser139	Mouse	1:500	Upstat e	05-636	pH9

2.1.7. Erythrolyse Puffer

Tabelle 8

Reagenz	Menge
NH ₄ Cl	8,29 g
KHCO ₃	1,00 g
0.2 M Na ₂ EDTA (pH 7.6)	500 µl
H ₂ O	auffüllen bis 1 L
NaOH or HCl	hinzufügen, bis pH 7,4 erreicht wird

2.1.8. Einstellungen der Plasmageräte

Tabelle 9

	DBD	APPJ
Gas	Argon	Argon
Gasfluss	10 l/min	nicht einstellbar
Amplitude	40 %	nicht einstellbar
Frequenz	6 kHz	nicht einstellbar
Gap distance	0,5 cm	0,5 cm
Behältnis der	Petrischale mit 5 cm	Petrischale mit 5 cm
Flüssigkeit	Durchmesser	Durchmesser
Menge der Flüssigkeit	7 mL	7 mL
Aktivierungszeit	variabel	variabel

2.2. Methoden

2.2.1. 2D Kultur der Zelllinien hESC, ISHIKAWA, HEC-1A

Die gefrorenen Zelllinien wurden im Wasserbad aufgetaut, in 10 mL vorgewärmtes DMEM P/S überführt und mit 1500 rpm für 10 min auf Raumtemperatur zentrifugiert.

Danach wurden die Überstände abgenommen und das Zellpellet wurde in DMEM FCS (10%) resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension in einen T25 Zellkulturflasche transferiert. Das Zellkultur Medium, in diesem Fall DMEM FCS (10%) wurde nach 24 Stunden einmalig gewechselt.

2.2.2. 2D Kultur Splitten

Das Medium wurde entfernt und die Zellen wurden einmalig mit PBS gewaschen. Nach der Entfernung des PBS wurde 0,05% Trypsin-EDTA in den Zellkulturflasche hinzugefügt und für etwa 5 min bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Die Ablösung der Zellen von der Zellkulturflaschenoberfläche wurde nach 5 min unter dem Mikroskop beurteilt und falls nötig, wurden die restlichen haftenden Zellen durch leichtes Klopfen gegen den Zellkulturflasche abgelöst. Daraufhin

wurde etwa 10-mal mehr vorgewärmtes DMEM FCS (10%) in die Zellkulturflasche hinzugefügt als Trypsin-EDTA, um dessen Reaktion mit den Zellen zu stoppen. Zellklumpen wurden durch wiederholtes auf- und abpipettieren aufgelöst und daraufhin wurde die Zellsuspension in eine 10 mL Zellkulturflasche mit vorgewärmten DMEM FCS (10%) gegeben. Aus dieser Zellsuspension wurde nun entsprechend der gewünschten Splitting Ratio ein Teil zur weiteren Kultur entnommen und erneut ausgesät. Die restlichen Zellen wurden entweder eingefroren oder verworfen.

2.2.3. 2D Kultur auf Coverslips

Um die 2D Zellen mit Paraformaldehyd zu fixieren und sie später anzufärben, wurden diese auf Coverslips kultiviert. Dafür wurden die Coverslips vorsichtig in die 48-Well Platte gelegt und für 3 s in die Mikrowelle gestellt. Durchschnittlich wurden 40000 Zellen pro Coverslip in die Wells pipettiert. Es wurde verhindert, dass die Zellen unter die Coverslips rutschten, indem man das Coverslip vorsichtig mit der Pipettenspitze auf den Boden des Wells drückte und die Zellsuspension langsam in kreisenden Bewegungen darauf pipettierte.

2.2.4. Paraformaldehyd-Fixierung von 2D Zellen

Das Medium wurde von den auf Coverslips kultivierten Zellen entfernt. Anschließend wurden 300 µl 3,7 % PFA auf die Zellen gegeben und diese 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das PFA wurde daraufhin entfernt und in einen geeigneten Abwurf gegeben und die Zellen wurden 3 Mal mit 1 mL PBS gewaschen. Nachdem man 400 µl PBS mit 0,1% NaN₃ auf die fixierten Zellen gegeben hatte, konnten diese bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.2.5. Probengewinnung

Diese Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und mit Genehmigung durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen durchgeführt (protocol codes 649-2017BO2, approval: 12.01.2018 and 495/2018BO2, approval: 19.10.2018). Alle Endometriose Proben stammten aus Endometriose Sanierungsoperationen

durchgeführt am Department für Frauengesundheit des Universitätsklinikums Tübingen.

Alle Patienten unterschrieben eine Einverständniserklärung zur Verwendung von Gewebeproben für Forschungszwecke.

Zunächst erfolgte eine Vorselektion des erhaltenen Endometriosegewebes zur Unterscheidung von beispielsweise Bindegewebe und Fett.

Abhängig von der Größe der erhaltenen Gewebeprobe wurde diese entweder als ganzes Stück verarbeitet oder aufgeteilt in mehrere Proben (Abb.1,A). Zunächst wurde die Probe mit einem sterilen Skalpell und Pinzette in kleine Stücke zerteilt (etwa 1-3 mm). Entsprechend der Menge an Probe wurden die Stücke in einen oder mehrere 2 mL Tuben gefüllt und dazu wurden Kollagenase (1:2) (meist 500 µl), *advanced* DMEM (1:2) (meist 500 µl) (später DMEM) und ROCK-Inhibitor Y27632 (1:1000) gegeben (Abb.1,B). Diese 2 mL Tuben mit den darin enthaltenen Stücken der Gewebeprobe wurden auf den Schütter mit 1000 rpm bei 37 °C zwischen 0,5-2 h gestellt, wobei die Verdauungszeit von der Textur und Menge der Endometriose Stücke abhing. Der Verdauungsprozess des Gewebes wurde visuell alle 20-30 min beurteilt. Bei gewünschter Trübung des Gemischs im 2 mL Tube (Abb.1,C) und abgesetzten Zellen (Abb.1,D) wurde der gesamte Inhalt in einen neuen 15 mL Falcon übertragen und bis etwa 8 mL mit PBS aufgefüllt. Das Ganze wurde daraufhin resuspendiert.

Nebenher wurde ein Zellfilter der Größe 100 µm auf ein 50 mL Falcon platziert und mit 2-3 mL PBS angefeuchtet. Anschließend wurde die resuspendierte Zellsuspension auf den 100 µm Filter gegeben (Abb.1,E). Große Zellstücke wurden maschinell mit einer leeren Pipettenspitze über den Filter bewegt, um die maximal mögliche Zellzahl zu filtern. Danach wurde der Filter noch einmal großzügig mit PBS gespült, bevor man ihn samt der verbliebenen Gewebestücke in einer Petrischale aufbewahrte (Abb.1,F), falls das Filtern zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt werden musste. Die Zellsuspension im 50 mL Falcon wurde bei 1500 rpm für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Daraufhin wurden die Überstände angenommen und das Zellpallet wurde auf Eis gelagert (Abb.1,G). Falls das Zellpallet eine rötliche Farbe hatte, wurde außerdem eine Erythrolyse durchgeführt, indem man 5 mL RBC Lyse Puffer für 5 min bei 4 °C hinzufügte.

Die Reaktion wurde gestoppt, nachdem man 10 mL PBS hinzufügte und das Ganze für 10 min bei Raumtemperatur mit 1500 rpm zentrifugierte.

Wenn nötig, wurde die Erythrolyse auch mehrere Male durchgeführt.

Die Menge an Zellsuspension wurde daraufhin manuell mit einer Pipette bestimmt. Entsprechend der gewünschten Anzahl an Wells auf einer 48-Well Platte wurde eine gewisse Menge an *Advanced* DMEM, später DMEM (vgl.3.3.) der Zellsuspension hinzugegeben, bevor man die Zellsuspension in der benötigten Menge Matrigel (BME) resuspendierte. Anschließend wurde das Gemisch aus Matrigel und BME in 20 µl großen Tropfen pro Well ausgesät. Die 48-Well Platte wurde dann für 30 min bei 37 Grad Celsius verkehrtherum in den Inkubator gestellt, sodass das BME eine stabile 3D-Tropfenform bilden konnte. Teile der Zellsuspension konnten auch vor dem Hinzugeben von BME herausgenommen werden und mit 700 µl *Freezing* Medium bei -80 °C eingefroren werden.

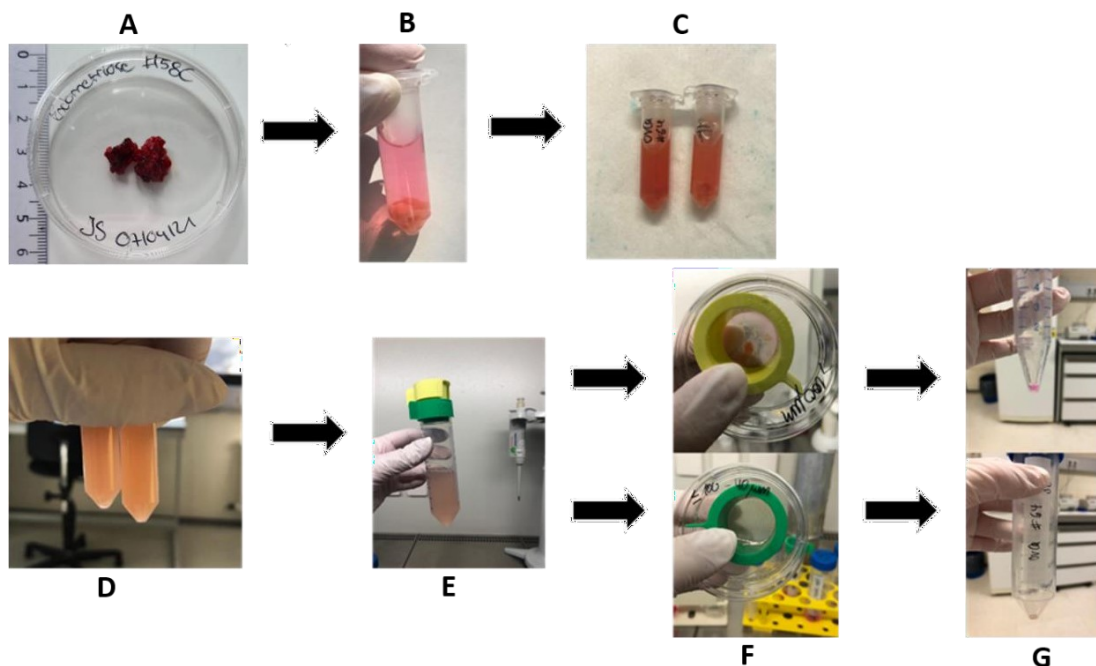


Abbildung 1: Systematischer Überblick der Endometriose Probengewinnung. Nach Erhalten des Endometriose Gewebes wird es gemessen und mechanisch zerkleinert (A). Die zerkleinerten Teile werden zur enzymatischen Verdauung in eine 2mL Tube gegeben (B). Getriebene Flüssigkeit einer fertigen enzymatischen Verdauung der Gewebeprobe (C) und das Zellpallet (D). (E) Die Zellsuspension wird durch einen Zellfilter gegeben, in diesem Beispiel durch einen der Größe 100 µm und zusätzlich einen 40 µm Filter. Überbleibendes Gewebe im Filter

wurde aufbewahrt (F). Abbildung der gefilterten Zellen im 50 mL Falcon nach Intubation und Entfernung des Überstandes, vorbereitet zum Aussähen (G).

2.2.6. Aufbereitung zu Organoiden und Kultur

Die Organoid Kultur wurde entweder direkt nach dem Prozessieren des Gewebes oder aus eingefrorenen Proben begonnen. Eingefrorene Proben wurden im Wasserbad aufgetaut, in 10 mL vorgewärmtes DMEM P/S transferiert und mit 1500 rpm, 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Überstände wurden entfernt, das Zellpellet in DMEM resuspendiert und die Zellsuspension zunächst bei 4 °C gelagert, bis zum eigentlichen Aussähen.

Abhängig von der Menge der Zellsuspension nach der Prozessierung des Patientengewebes wurde entweder die gesamte Zellsuspension zur Kultur verwendet oder ein Teil wurde weggefroren.

Das Matrigel wurde bei 4 °C in zusätzlich kühlenden Metallblöcken aufbewahrt, um Polymerisation zu verhindern, bis die Zellen ausgesät werden konnten. Ein 0,5 mL Tube wurde auf Eis gelagert, um es zu kühlen. Das Verhältnis der in DMEM resuspendierten Zellen zu BME war 1:1,5, um solide Tropfen erhalten zu können. Die Tropfen waren bei einer 48-Well Platte 20 µl pro Well groß, bei einer 96-Well Platte 10 µl pro Well. Die äußersten Reihen der Platten blieben frei. Etwa 30-60 s nach dem Aussähen der Tropfen wurde die Platte herumgedreht und so für 30 min bei 37 °C in den Inkubator gestellt, damit das Matrigel polymerisierte. Nach dieser Zeit wurden jeweils 270 µl Medium vorsichtig in die Wells mit einem Matrigel Tropfen gegeben, indem man das Medium langsam von der Seite des Wells hinein pipettierte. So wurde einer Beschädigung der Matrigel Tropfenstruktur entgegengewirkt.

PBS wurde in die leeren angrenzenden Reigen von Wells neben denen mit den Tropfen gefüllt und anschließend wurde die Platte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert.

Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Das frische Medium wurde vor dem Applizieren auf die Tropfen bei 37 °C erwärmt.

2.2.7. Passagieren und Einfrieren der Organoide

Jede Organoidlinie wurde einzeln und voneinander getrennt kultiviert, doch für alle galt dasselbe Protokoll. Sobald die Organoide zu dicht und voll wuchsen oder kein Wachstum mehr nachgewiesen werden konnte, wurden diese passagiert. Dafür wurde zunächst das Zellkulturmedium vorsichtig, ohne die Tropfen mit der Pipettenspitze zu berühren, entfernt und in ein 15 mL Falcon gegeben. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und dieses wurde daraufhin ebenfalls in den 15 mL Falcon überführt. Für das Loslösen der Tropfen wurde entweder 1 mL TrypLE oder kaltes DMEM pro 6 Wells mit einer Pipettenspitze aufgenommen. Die Tropfen wurden mit derselben Pipettenspitze maschinell abgelöst und daraufhin wurde der Milliliter auf die Wells mit den abgelösten Tropfen verteilt. In jedem Well wurde die Zellsuspension resuspendiert, bevor sie in ein frisches 2 mL Tube transferiert wurde. Die Wells, in denen zuvor die Tropfen waren, wurden erneut mit PBS gespült und dieses wurde in den 15 mL Falcon gegeben.

Die Organoide, die mit TrypLE behandelt wurden, wurden noch für 5 min bei 1400 rpm bei 37 °C inkubiert, wohingegen die Organoide behandelt mit DMEM direkt für den nächsten Schritt genutzt werden konnten.

Um die Zellsuspension in dem 2 mL Tube mechanisch zu verkleinern, wurde eine 27G Kanüle mit einer 1 mL Spritze verwendet. Mit dieser wurde die Zellsuspension 6-8-mal aufgezogen, um die Zellverbände voneinander zu trennen.

Diese Suspension wurde daraufhin ebenfalls in das 15 mL Falcon gegeben. Nachdem die Spritze und das 2 mL Tube noch einmal mit PBS gespült wurden, gab man dieses noch als letztes in den 15 mL Falcon dazu.

Das Falcon wurde für 10 min bei Raumtemperatur mit 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand daraufhin entfernt. Abhängig mit der Zellpellet Größe wurde dieses in DMEM resuspendiert. Je nach gewünschter Well-Anzahl der neuen Passage wurden Organoide aus dem Zellpellet teilweise mit 700 µl Freezing Medium bei -80 °C eingefroren oder erneut komplett ausgesät.

2.2.8. Mikroskopische Dokumentation mit dem EVOS-Mikroskop

Die Bilder der Organoide wurden immer direkt nach dem Aussähen (Tag 0) und vor dem Passagieren (letzter Tag der Passage sehr variabel 6-14) aufgenommen. Ansonsten jeden 3-4 Tag zur Dokumentation des Organoidwachstums und Entscheidung über das Passagieren (ergänzende Abb.1).

Die Bilder wurden mit der Software M7000 von ThermoFisher aufgenommen. Die dabei verwendeten Einstellungen bestanden darin, etwa 80 % der Wells mit 4-facher Vergrößerung im '*transillumination mode*' mit dem EVOS-Mikroskop.

2.2.9. Paraformaldehyd-Fixation von Organoiden

Um die Endometrioseorganoide zu fixieren, wurde zunächst das Medium aus jedem Well entfernt und alle Wells wurden einmal mit PBS gewaschen. Um das Matrigel aufzulösen, wurden 250 µl/ Well von Dispase (1 mg/mL) zu den Wells hinzugefügt, bevor die Tropfen mit einer Pipettenspitze abgelöst wurden. Die Platte wurde daraufhin für 15 min in den Inkubator bei 37 °C gelegt.

Für jeden nachfolgenden Schritt wurden die Tuben und Pipetten Spitzen, die benutzt wurden, mit 1 % BSA in PBS ummantelt, um das Haften der Zellen an den Materialien und damit deren Verlust zu vermeiden.

Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension in den Wells mit 1 mL 1% BSA/Well resuspendiert und dann in ein 15 mL Tube mit 2,0 mL 1% BSA darin transferiert. Die Zellen wurden einmal mit 1 % BSA gewaschen, in ein 15 mL Tube transferiert und daraufhin für 5 min mit 1025 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 1 mL 3,7 % PFA wurde zu dem Zellpellet hinzugefügt. Nachdem das Ganze resuspendiert wurde, wurde die Probe in ein 1,5 mL Tube überführt. Nachdem es darin für 30 min bei Raumtemperatur inkubierte, wurde die Probe bei 2000 rpm für 3 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und in einen entsprechend gekennzeichneten Müll-Falkon gegeben. Nachdem das Zellpellet mit PBS gewaschen und erneut bei 2000 rpm für 3 min zentrifugiert wurde, wurde der Überstand erneut in ein PFA-Müll-Falkon gegeben. Im nächsten Schritt wurde das Zellpellet mit 250 µl 25 % EtOH resuspendiert und 10 min inkubiert. Daraufhin wurden 300 µl von 70 % EtOH in

die Suspension hinzugefügt und nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 min noch einmal 600 µl von 96% EtOH. Die Probe wurde so bei 4 °C gelagert.

2.2.10. Paraffin-Einbettung der Paraformaldehyd fixierten Organoid

Histogel und eine 200 µl Pipettenspitze/Probe wurde in einem Wärmeblock bei 65 Grad Celsius platziert. Der Überstand wurde von den bei 4 °C gelagerten PFA-fixierten Organoiden entfernt. Der obere Teil der Pipettenspitze wurde entfernt, auf Parafilm platziert und dann auf einen kalten Metallblock gelegt.

Nun wurde das vorgewärmte Histogel zu dem Organoid Pellet gegeben und für 30 s bei 65 °C inkubiert, bevor es zur *modal* für die Organoid Suspension mit einer in 1 % BSA ummantelten Pipettenspitze gegeben wurde. Das Pellet wurde daraufhin für 5 min bei -20 °C inkubiert. Die nun gefrorene Probe wurde in eine Einbettungskassette transferiert und für zwei Mal 1 h in 70 % EtOH inkubiert. Danach in 96 % EtOH für zwei Mal 1 h, ein Mal 1 h in EtOH und dann über Nacht in 100 % EtOH.

Am nächsten Tag wurde die Probe für zwei Mal 1 h in Xylol und anschließend drei Mal 45 min in Paraffin platziert. Für jede Probe wurde jeweils ein Einbettungs-Metall bei 65 °C vorgewärmt, mit Paraffin aufgefüllt und nachdem das Organoid Pellet aus der Einbettungskassette genommen wurde, wurde dieses in der Mitte der *modal* platziert.

Die Einbettungskassette wurde daraufgesetzt und mit Paraffin gefüllt. Nach 15 min bei -20 °C wurde die Einbettungskassette mit dem Organoid Pellet von der Einbettungs Metall *modal* abgenommen und bei Raumtemperatur gelagert, bis sie geschnitten wurden.

2.2.11. Endparaffinierung der Paraffin-eingebetteten Organoidschnitte

Die in Paraffin eingebetteten Organoiden wurden vorbereitend geschnitten. Vor dem Endparaffinieren war es wichtig, die Organoiden auf den Objektträgern zu kennzeichnen, indem man ihre Außengrenzen von der Rückseite des Objektträgers mit einem Diamantstift in das Glas einritzte. Dadurch würde man nach dem Endparaffinieren noch wissen, an welchen Stellen sich die Organoiden

befinden. Für das Endparaffinieren der Objektträger wurden diese für drei Mal 10 min in Xylol, zwei Mal 3 min in 100 % EtOH, zwei Mal 3 min in 96 % EtOH, ein Mal 3 min in 75 % EtOH und ein Mal 5 min in 75 % EtOH gegeben und anschließend 5 min in Wasser gewaschen.

Bis die endparaffinierten Objektträger weiterverwendet wurden, wurden sie in PBS gelagert.

2.2.12. Antigen-Retrieval der Endparaffinierten Organoidschnitte

Die bereits vorbereiteten Puffer (Tabelle 5,6) wurden bei Raumtemperatur gelagert. Ein Glasbehälter wurde mit 300 mL Puffer aufgefüllt und in der Mikrowelle bei 800 Watt für etwa 2 min erhitzt, bis die Lösung eine Temperatur von über 90 °C erreichte. Daraufhin wurden die endparaffinierten Objektträger platziert in einem Metallgitter in den Behälter mit dem vorgewärmten Puffer gegeben und für 10 min bei 180 Watt in der Mikrowelle darin inkubiert. Dabei war zu beachten, dass der Puffer nicht zu kochen begann und eine Temperatur zwischen 90-100 °C während des Antigen-Retrieval beibehielt. Nach der Inkubationszeit sollte der Glasbehälter samt der Objektträger darin auf Raumtemperatur abkühlen. In der Zeit vor der weiteren Verarbeitung sollten die Objektträger nach dem Abkühlen in PBS gelagert werden.

2.2.13. Immunfluoreszenz Färbung bei Paraffin fixierten Organoiden und Paraformaldehyd-fixierten 2D Zellen

Nach der Endparaffinierung und dem Antigen-Retrieval der Objektträger mit den darauf fixierten Organoiden waren die Voraussetzungen für die Immunfluoreszenz Färbung dieser erfüllt. Auf den Luft getrockneten Objektträgern wurden die Grenzen der Proben mit einem ImmEdge Fettstift eingekreist und stellen somit für nachfolgende Schritte eine Begrenzung dar.

Alle nachfolgenden Inkubationen erfolgten im Dunklen innerhalb einer folierten Box bei Raumtemperatur. Alle Lösungen wurden in individueller Menge auf die eingekreisten Stellen aufgetragen, bis ein Kuppel-artiger Tropfen diese bedeckte. Alle Stellen mit Organoiden wurden mit „Pro Diamond DAPI“ überdeckt, welches zuvor bei 37 °C vorgewärmt wurde.

Zunächst wurden die Proben in PBS-T für 5 min gewaschen und daraufhin für 3 min mit 0,2 % Triton X in PBS permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschrift für 3 mal 5 min mit PBS-T wurde die Probe für 30 min mit 4 % BSA in PBS-T geblockt. Als nächstes wurde der erste Antikörper in 4 % BSA in PBS-T entsprechend der Materialien verdünnt (Tabelle 7) und für 1 h auf die Organoide zur Inkubation gegeben. Bevor der zweite Antikörper auf die Organoide gegeben wurde, wurden diese noch 3-mal für 5 min mit PBS-T gewaschen. Der zweite Antikörper wurde ebenfalls in 4 % BSA in PBS-T entsprechend der Materialien verdünnt und inkubierte auch für 1 h bei Raumtemperatur. Als nächstes folgte ein weiterer Waschschrift für 3 mal 5 min mit PBS-T und danach eine Inkubation der Organoide in 1 x DAPI in PBS-T (1:1000) für 5 min. Die Coverslips wurden kurz in 100 % EtOH eingetaucht, danach luftgetrocknet und anschließend auf die Objektträger mit den Organoiden gegeben, nachdem 2 µl Mounting-Medium auf die Probe gegeben wurde. Das beschriebene Protokoll wurde ebenfalls für die PFA-fixierten 2D Zellen angewendet. Da diese jedoch auf Coverslips fixiert wurden, wurde alles auf die Coverslips appliziert. Am Ende wurden die Coverslips mit den nun gefärbten Zellen schnell in 100 % EtOH gegeben und luftgetrocknet. Das Mounting-Medium wurde auf einen leeren Objektträger appliziert und die Coverslips vorsichtig daraufgelegt.

Die angefärbten Proben wurden über Nacht zunächst in einem flachen Objektträger im Dunklen bei Raumtemperatur gelagert und daraufhin bei 4 °C .

2.2.14. Mikroskopische Dokumentation der Immunfluoreszenz Färbung bei Organoiden und 2D Zellen

Mindestens 24 h nach der Immunfluoreszenz Färbung konnten die Objektträger mikroskopiert werden. Die Bilder wurden mit der Software M7000 von ThermoFisher aufgenommen. Die allgemeinen Einstellungen waren 10, 20 und 40-fache Vergrößerung in DAPI, GFP und Tx Red im EVOS Mikroskop. Licht und Exposition variierten bei den jeweiligen Bildern, wohingegen der Wert der Blendenstufe für alle Bilder konstant der Wert 1 war.

2.2.15. Plasmabehandlungen

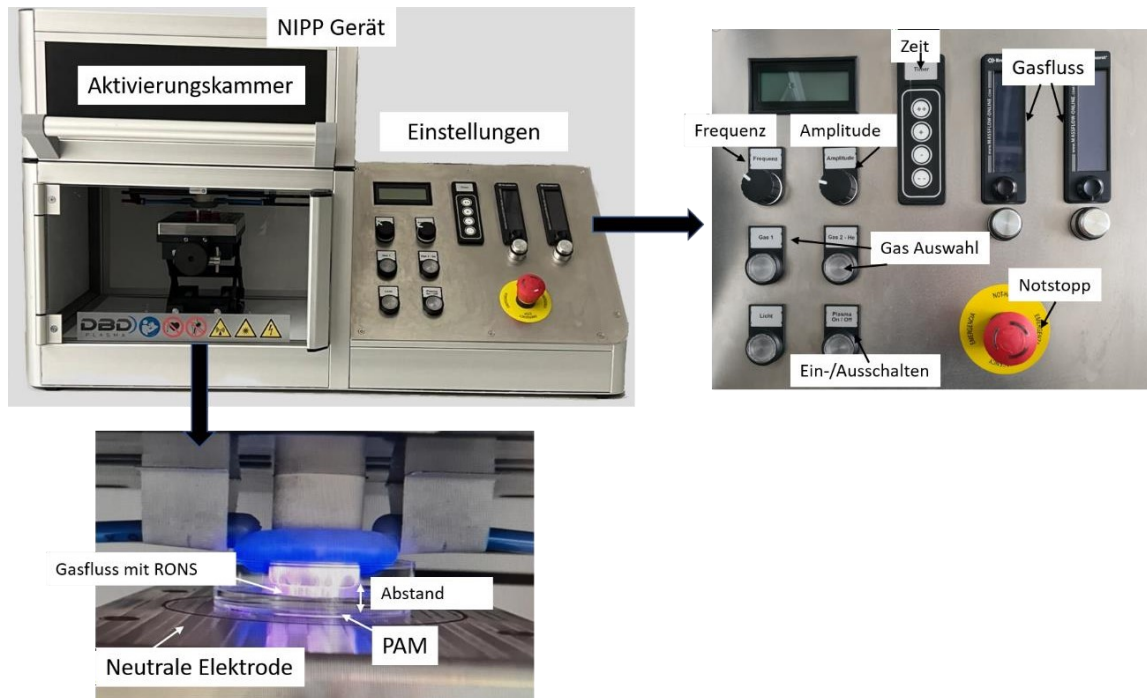


Abbildung 2: Systematische Darstellung des verwendeten DBD-Plasmageräts. Abgebildet sind die Aktivierung des Mediums durch das Gerät generierte NIPP und die einzelnen Einstellungen zur NIPP-Generierung.

Die Plasmabehandlung erfolgte indirekt über die Aktivierung von Medium. Der Großteil der Plasmabehandlungen wurde durch Verwendung des DBD-Geräts durchgeführt. Parameter des Gerätes und des Mediums, welche bei der Herstellung des PAMs von Bedeutung waren, sind: verwendetes Gas, der Gasfluss, Amplitude und Frequenz des Plasmastrahls, Aktivierungszeit, der Abstand zwischen Flüssigkeitsoberfläche und Elektrode (*gap distance*), der Behälter des zu aktivierenden Mediums und die Menge des zu aktivierenden Mediums.

Um die Sterilität des PAMs zu gewährleisten, wurde dabei beachtet, das zu aktivierende Medium unter einer sterilen Bank abzufüllen und den Behälter beim Herausnehmen mit dem Deckel zu verschließen. Der Deckel wurde erst innerhalb der Plasmakammer bei bereits laufendem Gasfluss abgenommen. Nach Beendigung der Aktivierung der Flüssigkeit mit Plasma wurde der Deckel erneut auf den Behälter gesetzt, ohne diesen aus dem Gasfluss zu entfernen. Dabei wurden stets Handschuhe getragen.

Eine Desinfizierung der Plasmakammer war ebenfalls möglich. So konnte die sterile Aktivierung des PAMs gewährleistet werden. Für das bei 3.4. vergleichend verwendete APPJ-Gerät wurden Amplitude, Frequenz und Gasfluss nicht manuell eingestellt.

2.2.16. Crystal-Violet staining Assay der Plasmabehandelten 2D-Zellen

Für die Durchführung des *Crystal Violet staining Assays* wurde die 0,5 % *Crystal Violet* Lösung (100 ml) aus 500 mg *Crystal Violet*, 25 ml Methanol und 75 ml Wasser hergestellt. Die Lösung kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

Crystal Violet färbt Zellkerne in einer dunkellila Farbe und visualisiert lebende Zellen. Zunächst wurde das komplette Medium auf den adhärennten 2D-Zellen in einer 96-Well Platte entfernt, indem man es einmal kräftig in den Abwurf schüttete. Daraufhin wurden die Zellen für 10 min mit 100 % Methanol fixiert (50 µl per Well). Das Methanol wurde auf dieselbe Weise entfernt wie zuvor das Medium. Nachdem man die Platte kurz hat trocknen lassen, wurde die *Crystal Violet* Lösung auf die Zellen gegeben (50 µl per Well).

Das *Crystal Violet* inkubierte auf den Zellen für 3-4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei einer Lagerung von 4 °C .

Daraufhin wurde das *Crystal Violet* vorsichtig mit der Pipette entfernt, ohne die Wells zu berühren, um die Färbung nicht zu beschädigen. Die Platten wurden danach einige Male in Wasser ausgewaschen, bis sie keine Farbe mehr abgaben.

Als letzten Schritt wurden die Platten verkehrtherum an den Deckel gelehnt über Nacht getrocknet und dabei von Alufolie bedeckt, sodass sie vor Licht geschützt waren.

Die Platten wurden anschließend zur Auswertung eingescannt und mit *ImageJ* quantifiziert.

2.2.17. CellTiter-Glo Assay der Plasmabehandelten 3D Zellen

Zur Anwendung des *CellTiter-Glo 3D Assays* wurden die Organoide in einer 96-Well Platte kultiviert, bis die unbehandelten Kontrollen die gewünschte Dichte

und Größe erreicht hatten (nach 144 h, 72 h nach Beginn der PAM-Behandlung). Das *CellTiter-Glo* 3D Reagenz wurde vor Beginn des Assays für etwa eine Stunde aufgetaut, bis diese Raumtemperatur erreichte. Die Zellkultur Platten wurden ebenfalls vor Beginn des Versuches auf Raumtemperatur gebracht.

Zunächst wurde das Medium von den Organoiden entfernt und diese wurden mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden 40 µl DMEM pro Well auf die Zellen gegeben und anschließend 50 µl des *CellTiter-Glo* 3D Reagenz. Die Platte wurde für 15 min auf den Schüttler bei 900 rpm gestellt und mit Alufolie abgedeckt, um Lichteinflüsse zu vermeiden. Nach der Inkubationszeit wurde unter dem Mikroskop überprüft, ob das Matrigel in den Wells sich aufgelöst hat. Falls ja, wurden die 90 µl Zellsuspension pro Well resuspendiert und in eine weiße 96-Well Platte mit flachem Boden transferiert.

Nach der Übertragung aller Wells auf die weiße 96-Well Platte konnte diese im Varioskan LUX ausgelesen werden. Hierfür wurde das Platten Layout in das Programm übertragen und folgenden Protokoll ausgewählt: Messordnung 1 (Auslesung von links nach rechts), Lumineszenz (Zeit der Messung 1000 ms).

2.2.18. Luciferase Assay zur Testung konditionierten Mediums

Um das konditionierte Medium zu Testen wurden 10000/Well der Wnt-Reporter Zelllinie MDA-MB-231 in einer weißen 96-Well Platte für den *Luciferase Steady-Glo Assay* ausgesät. Einen Tag danach wurden die zu testenden konditionierten Medien in gewünschten Verdünnungen auf die Zellen gegeben (50 µl pro Well), nachdem deren Medium zuvor entfernt worden war und man sie mit PBS gewaschen hatte.

Die Zellen inkubierten für 24 Stunden in den konditionierten Medien. Am nächsten Tag wurde das *Steady-Glo Luciferase* Reagenz aufgetaut, bis es Raumtemperatur erreichte. Das Medium wurde durch Verwendung der Vakuum Pumpe von den Zellen entfernt und diese wurden in 50 µl PBS pro Well inkubiert, bis sie ebenfalls Raumtemperatur erreichten.

Anschließend wurde 50 µl des Luciferase Reagenz pro Well hinzugegeben, gemischt und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert.

Die Inkubationszeit der Zellen in dem Reagenz betrug minimal 5 min und maximal 5 h. Die Platte wurde im Varioskan LUX mit dem Lumineszenz Protokoll (Zeit der Messung 1000 ms) ausgelesen.

2.2.19. Auswertung *ImageJ*

Folgende Schritte der Auswertung erfolgten in *ImageJ*:

- Zuschneiden der verwendeten Bilder: *Edit > Selection > Specify; Image > Crop*
- Skalierung der verwendeten Bilder: *Analyze > Set Scale; Analyze > Tools > Scale Bar*
- Bestimmung der *Area Percentage*: *Image > Type > RGB-Stacks; Image > Adjust > Threshold; Analyze > Set Measurements; Analyze > Analyze Particles*
- Bestimmung der mittleren Organoid Durchmesser: Markierung der Organoide manuell mit *freehand lines > Ctrl M >* nach Messung der entsprechenden Organoid Anzahl: *Results > Summarize*

2.2.20. Statistische Auswertung

Die Auswertung und Darstellung der erhobenen Daten erfolgte durch Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint und Prism (GraphPad). Die jeweils verwendeten Testverfahren wurden im zugehörigen Abschnitt erläutert. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1. Etablierung verschiedener Konditionen der Plasmaaktivierung bei 2D kultivierten Endometriumkarzinomzelllinien

Zunächst wurden die zellulären Effekte verschiedener Plasmaparameter für die PAM-Generierung an HEC-1A und hESC Zelllinien in 2D-Zellkultur charakterisiert. Um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurden die Zelllinien außerhalb der PAM-Inkubationszeiten stets in DMEM FCS (10%) kultiviert.

Als Standardparameter der PAM-Generierung mittels DBD-Plasmaquelle wurden ein Argongasfluss von 10 l/min, eine Amplitude von 40 %, eine Frequenz von 6000 Hz und ein Abstand von 5 mm zur Flüssigkeitsoberfläche definiert, die eine stabile und homogene Plasmaentladung gewährleisten. Für die PAM-Generierung wurden stets definierte Volumina von DMEM (*catalognumber: 41965-039; DMEM, high glucose*) in einer Zellkulturschale verwendet. Für die PAM-Inkubation wurden jeweils 3.000 Zellen und 100 µl PAM pro Well einer 96-Well Zellkulturplatte eingesetzt und für 4 h inkubiert. Je nach Fragestellung wurden PAM-Verdünnungen von 1:100, 1:50, 1:25, 1:12, 1:8, 1:4, 1:2 und 1:1 mit der Vehikelbehandelten (Argongas) Kontrolle verglichen. Die zelluläre Viabilität wurde nach Erreichen einer 100% Konfluenz der Kontrollen (5-7 Tage) mit *Crystal Violet staining Assay* ermittelt.

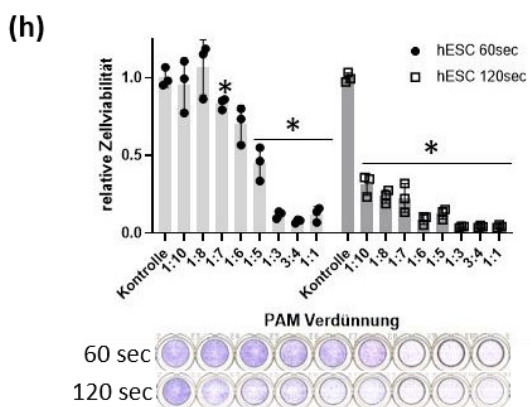
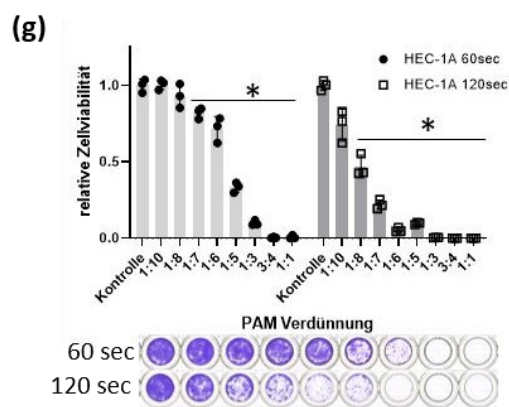
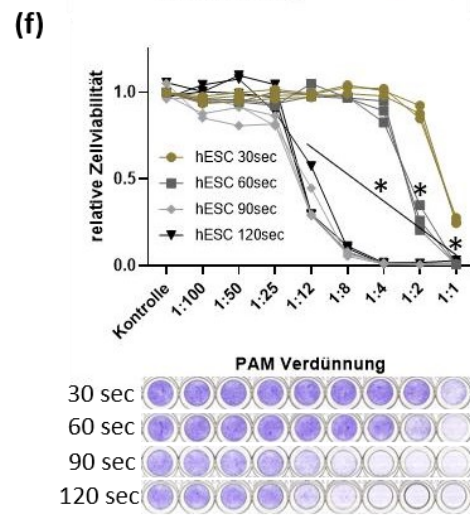
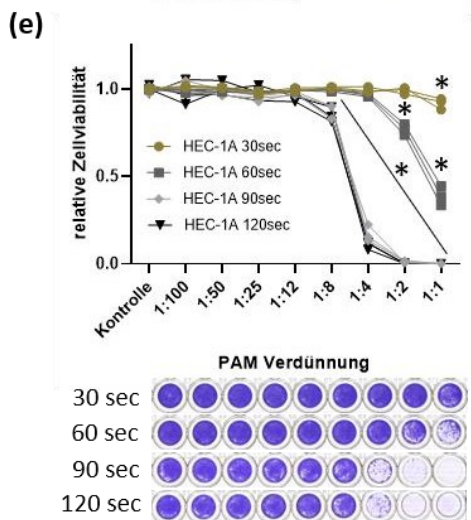
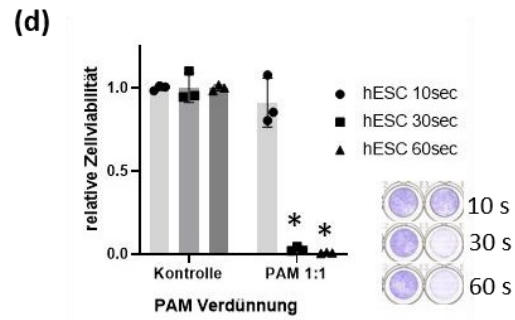
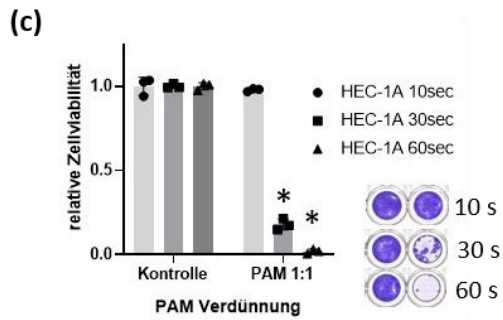
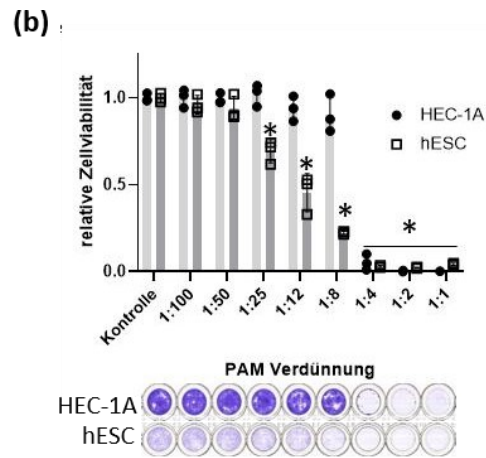
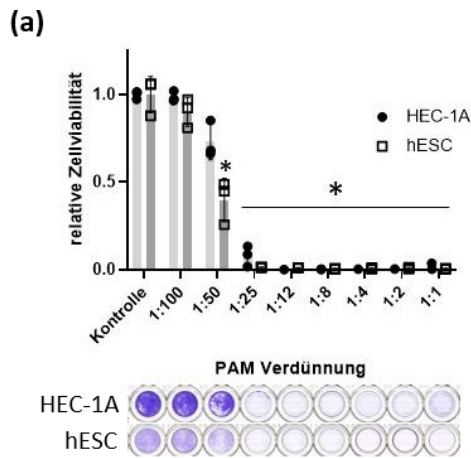


Abbildung 3: Etablierung verschiedener Parameter der Plasma Aktivierung bei in 2D kultivierten Endometriumkarzinomzelllinien. HEC-1A und hESC Zelllinien wurden mit PAM behandelt, das mittels oben angegebener Plasmaparameter generiert wurde. Zelllinien wurden mit Hilfe des *Crystal Violet staining Assay* nach 5-7 Tagen analysiert. Dosisabhängige relative Zellviabilität von HEC-1A und hESC Zellen nach frequenzabhängiger PAM-Generierung mit 28,5 kHz (a) und 6 kHz (b). Relative Zellviabilität von HEC-1A (c) und hESC (d) nach der Behandlung mit 10, 30 und 60 s aktiviertem PAM. Dosisabhängige relative Zellviabilität von HEC-1A (e) und hESC (f) abhängig von den angegebenen Aktivierungszeiten und PAM-Verdünnungen. Dosisabhängiges relatives Zellviabilität von HEC-1A (g) und hESC (h) Zellen nach der PAM-Behandlung mit schmalen Verdünnungsbandbreiten und abhängig von Aktivierungszeiten von 60 und 120 s. Die Ergebnisse sind als Einzelwerte und Mittelwert \pm SD nach $n=3$ unabhängigen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$, bestimmt durch gepaarten Student's t-test.

Um die Einflüsse von Amplitude und Frequenz auf die zellulären PAM-Effekte zu ermitteln, wurden Frequenzen zwischen 28,5 kHz und 6 kHz miteinander verglichen. PAM-Generierung mit einer Frequenz von 28,5 kHz zeigte einen signifikanten Einfluss auf die relative Zellviabilität der hESC Zelllinie ab einer PAM-Verdünnung von 1:50 (Aktivierungszeit: 120 s: Verdünnung: 1:50: 2,54-fold, $p=0,02$; 1:25: 78,36-fold, $p=0,004$; 1:12: 107,88-fold, $p=0,004$; 1:8: 206,78-fold, $p=0,004$; 1:4: 148,88-fold, $p=0,004$; 1:2: 126,17-fold, $p=0,004$; 1:1: 218,94-fold, $p=0,004$) und auf die relative Viabilität der HEC-1A Zelllinie ab einer PAM-Verdünnung von 1:25 (Aktivierungszeit: 120 s: Verdünnung: 1:25: 12,77-fold, $p=0,002$; 1:12: 407,24-fold, $p=0,0002$; 1:8: 515,83-fold, $p=0,0002$; 1:4: 396,8-fold, $p=0,0002$; 1:2: 442,14-fold, $p=0,0002$; 1:1: 74,04-fold, $p=0,0002$).

Der starke zytotoxische Einfluss des PAMs bei bereits hohen Verdünnungsstufen wurde sowohl auf die Verwendung der hohen Frequenz von 28,5 kHz als auch das geringe plasmaaktivierte DMEM Volumen zurückgeführt. In einem zweiten Versuchsaufbau (Abb.3b) wurden folgende Parameter optimiert:

Als optimierte Parameter wurden eine Frequenz von 6 kHz sowie ein Volumen von 7 ml DMEM in einer 5 cm Zellkulturschale gewählt.

Per *Crystal Violet staining Assay* konnte auch mittels optimierter Parameter ein signifikanter Einfluss des PAMs auf das relative Zellviabilität der hESC Zelllinie ab einer Verdünnung von 1:25 (Aktivierungszeit: 120 s: Verdünnung: 1:25: 1,44-fold, $p=0,012$; 1:12: 2,21-fold, $p=0,017$; 1:8: 4,47-fold, $p=0,0004$; 1:4: 33,75-fold,

p=0,0001; 1:2: 42,86-fold, p=0,0002; 1:1: 23,38-fold, p=0,0001) und auf die HEC-1A Zelllinie ab 1:4 (Aktivierungszeit 120 s: Verdünnung: 1:4: 18,52-fold, p=0,0003; 1:2: 255,5-fold, p=0,0002; 1:1: 389,97-fold, p=0,0002) (Abb.3b).

Diese oben genannten optimierten Parameter (Frequenz: 6 kHz, Amplitude: 40 %, DMEM Volumen: 7 ml, Fläche: 5 cm Zellkulturschale) der PAM-Generierung wurden für nachfolgende Experimente konsequent weiterverwendet.

In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss der Aktivierungszeit auf die relative Zellviabilität von HEC-1A (Abb.3c) und hESC (Abb.3d) untersucht. Hierfür wurden Aktivierungszeiten von 10, 30 und 60 s und zunächst keine PAM-Verdünnungsstufen (Verhältnis 1:1) verwendet. Sowohl bei HEC-1A (Abb.3c) als auch hESC (Abb.3d) konnte ein signifikanter Einfluss des PAMs auf die relative Zellviabilität ab einer Aktivierungszeit von 30 s gezeigt werden (Verdünnung: 1:1: HEC-1A: Aktivierungszeit: 30 s: 5,63-fold, p=0,0009; 60 s: 54,94-fold, p=7,2388E-05; hESC: Aktivierungszeit: 30 s: 35,46-fold, p=0,003; 60 s: 137,61-fold, p=0,0002).

Im nächsten Schritt wurden die Aktivierungszeiten von 30 und 60 s für HEC-1A (Abb.3e) und hESC (Abb.3f) um weitere Aktivierungszeiten von 90 und 120 s erweitert und von diesen Aktivierungszeiten zusätzlich unterschiedliche PAM-Verdünnungsstufen (1:100, 1:50, 1:25, 1:12, 1:8, 1:4, 1:2 und 1:1 sowie Argonkontrolle) untersucht.

Bei HEC-1A (Abb.3e) wurde bei einer Aktivierungszeit von 30 s erst bei der Verwendung von 1:1 PAM ein Einfluss auf die relative Zellviabilität nachgewiesen (Aktivierungszeit: 30 s: Verdünnung: 1:1: 1,1-fold, p=0,048).

Wohingegen bei 60 s bereits ab einer Verdünnungsstufe von 1:4 eine durchgängige Signifikanz festzustellen war (Aktivierungszeit: 60 s: Verdünnung: 1:4: 1,04-fold, p=0,02; 1:2: 1,3-fold, p=0,006; 1:1: 2,57-fold, p=0,002).

Mit einer Aktivierungszeit von 90 s zeigte sich ab einer PAM-Verdünnungsstufe von 1:8-1:1 ein signifikanter Einfluss auf die Zellviabilität von HEC-1A (Aktiverungszeit: 90 s: Verdünnung: 1:8: 1,14-fold, p=0,04; 1:4: 5,81-fold, p=0,0006; 1:2: 74,04-fold, p=0,0002; 1:1: 483,6-fold, p=0,0002). Bei 120 s Aktivierungszeit konnte ein durchgängiger signifikanter Effekt auf die relative Zellviabilität ab einer Verdünnung von 1:8 aufgezeigt werden (Aktivierungszeit:

120 s: Verdünnung: 1:8: 1,18-fold, $p=0,03$; 1:4: 9,35-fold, $p=0,00004$; 1:2: 369,44-fold, $p=0,0002$; 1:1: 1588,6-fold, $p=0,0002$).

Bei hESC (Abb.3f) konnte bei einer Aktivierungszeit von 30 s keine Signifikanz nachgewiesen werden. Unter Verwendung einer Aktivierungszeit von 60 s wurde ein signifikanter Einfluss auf die relative Zellviabilität ab einer Verdünnung von 1:2 gezeigt (Aktivierungszeit: 60 s: Verdünnung: 1:2: 3,68-fold, $p=0,04$; 1:1: 126,12-fold, $p=0,03$).

Unter Verwendung einer Aktivierungszeit von 90 s wurde bei einer höheren Verdünnungsstufe bereits eine Signifikanz bezüglich der relativen Zellviabilität festgestellt (1:25) als bei 120 s (1:12) (Aktivierungszeit: 90 s: Verdünnung: 1:25: 1,21-fold, $p=0,01$; 1:12: 2,92-fold, $p=0,009$; 1:8: 14,75-fold, $p=0,0007$; 1:4: 84,86-fold, $p=0,0006$; 1:2: 114,49-fold, $p=0,0008$; 1:1: 94,91-fold, $p=0,0009$) (Aktivierungszeit: 120 s: Verdünnung: 1:12: 2,6-fold, $p=0,03$; 1:8: 10,32-fold, $p=0,002$; 1:4: 81,51-fold, $p=0,0009$; 1:2: 66,14-fold, $p=0,0008$; 1:1: 56,04-fold, $p=0,0009$).

In weiteren Experimenten wurde der PAM Wirkungsbereich zwischen den Verdünnungsstufen 1:10 und 1:1 höher aufgelöst (1:10, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:3, 3:4, 1:1) (Abb.3g,h) mit den Aktivierungszeiten 60 und 120 s untersucht.

Bei einer Aktivierungszeit von 60 s wurde bei HEC-1A (Abb.3g) ein signifikanter Einfluss auf die relative Zellviabilität ab einer Verdünnung von 1:7 gezeigt (Aktivierungszeit: 60 s: Verdünnung: 1:7: 1,22-fold, $p=0,02$; 1:6: 1,4-fold, $p=0,03$; 1:5: 3,0-fold, $p=0,002$; 1:3: 10,13-fold, $p=0,0006$; 3:4: 233,95-fold, $p=0,0006$; 1:1: 136,66-fold, $p=0,0006$). Bei der hESC Zelllinie (Abb.3h) konnte ebenfalls ab einer Verdünnung von 1:7 eine signifikante Reduktion der relativen Zellviabilität beobachtet werden (Aktivierungszeit: 60 s: Verdünnung: 1:7: 1,2-fold, $p=0,03$; 1:5: 2,24-fold, $p=0,02$; 1:3: 8,27-fold, $p=0,0005$; 3:4: 12,83-fold, $p=0,001$; 1:1: 8,07-fold, $p=0,0003$). Für eine Aktivierungszeit von 120 s wurde bei HEC-1A (Abb.3g) ab einer PAM-Verdünnungsstufe von 1:8 eine Signifikanz bezüglich der relativen Zellviabilität nachgewiesen und bei hESC (Abb.3h) bereits ab 1:10 (Aktivierungszeit: 120 s, HEC-1A: Verdünnung: 1:8: 2,14-fold, $p=0,009$; 1:7: 4,54-fold, $p=0,00005$; 1:6: 18,8-fold, $p=0,0007$; 1:5: 10,35-fold, $p=0,0005$; 1:3: 350,48-fold, $p=0,0004$; 3:4: 1051,43-fold, $p=0,0003$; 1:1: 2453,33-fold, $p=0,0003$; hESC:

Verdünnung: 1:10: 3,19-fold, $p=0,002$; 1:8: 4,22-fold, $p=0,0008$; 1:7: 4,39-fold, $p=0,003$; 1:6: 11,51-fold, $p=0,0002$; 1:5: 7,98-fold, $p=0,002$; 1:3: 24,45-fold, $p=0,0002$; 3:4: 23,65-fold, $p=0,0002$; 1:1: 22,76-fold, $p=0,0005$).

Im Hinblick auf eine potentielle klinische Anwendung, ist die Aktivierung alternativer und klinisch etablierter Medien im Vergleich zu plasmaaktiviertem DMEM von Relevanz. Im Folgenden wurde der zytotoxische Effekt von jeweils 120 s plasmaaktiviertem NaCl (Abb.4a) und PBS (Abb.4b) auf HEC-1A und hESC-Zelllinien untersucht. Sowohl für plasmaaktiviertes NaCl (Abb.4a) als auch für plasmaaktiviertes PBS (Abb.4b) konnte ein signifikanter Einfluss auf die relative Zellviabilität von HEC-1A und hESC für die Verdünnungen 1:8, 1:4 und 1:1 nachgewiesen werden (Medium: NaCl: Aktivierungszeit: 120 s, HEC-1A: Verdünnung: 1:8: 1,17-fold, $p=0,03$; 1:4: 5,06-fold, $p=0,0004$; 1:1: 3034,2-fold, $p=0,0003$; hESC: Verdünnung: 1:8: 1,48-fold, $p=0,04$; 1:4: 16,98-fold, $p=0,001$; 1:1: 29,22-fold, $p=0,0009$; Medium: PBS: Aktivierungszeit: 120 s, HEC-1A: Verdünnung: 1:8: 1,27-fold, $p=0,002$; 1:4: 11,7-fold, $p=0,00002$; 1:1: 88,4-fold, $p=0,00002$; hESC: Verdünnung: 1:8: 2,05-fold, $p=0,002$; 1:4: 17,99-fold, $p=0,008$; 1:1: 21,32-fold, $p=0,006$).

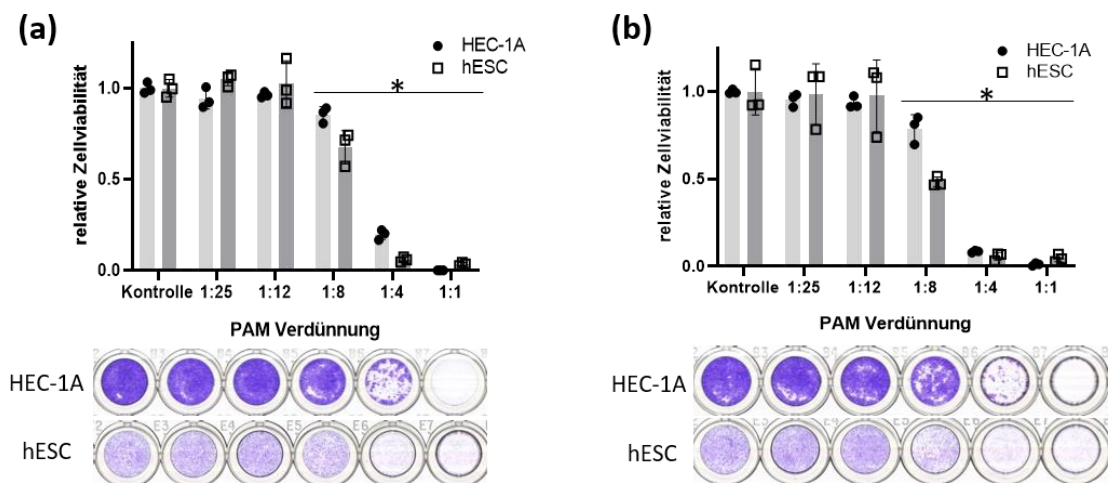


Abbildung 4: Charakterisierung unterschiedlicher Medien zur PAM-Generierung. HEC-1A und hESC wurden für 4 h mit 120 s aktiviertem NaCl (Abb.4a) und PBS (Abb.4b) in verschiedenen PAM-Verdünnungsstufen behandelt. Die relative Zellviabilität wurde nach 5-7 Tagen mittels Crystal Violet staining Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind als Einzelwerte und Mittelwert \pm SD nach $n=3$ unabhängigen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$, bestimmt durch gepaarten Student's t-test.

Unter Verwendung der HEC-1A Zelllinie generiert aus malignen Ursprungszellen und der hESC Zelllinie generiert aus benignen ließen sich zusammenfassend aus den obigen Versuchen bezüglich Aktivierungszeit und Verdünnungen des PAMs folgende Erkenntnisse gewinnen.

Eine Aktivierungszeit von 30 s hat zu den gegebenen Bedingungen höchstens bei einer Konzentration des PAMs von 100 % einen signifikanten Einfluss auf die zelluläre Viabilität der untersuchten Zelllinien HEC-1A und hESC.

PAM spezifische Effekte auf HEC-1A und hESC sind sowohl von der Aktivierungszeit abhängig, als auch vom Volumen des aktivierten Mediums. Signifikante Effekte auf die zelluläre Viabilität können dosisabhängig auch bei PAM-Verdünnungsstufen nachgewiesen werden.

Insgesamt weist die Zelllinie hESC eine höhere PAM-Sensibilität auf als HEC-1A.

Auch die Aktivierung von NaCl und PBS als klinisch relevante Medien führt bei einer Aktivierungszeit von 120 s zu einer signifikant verringerten zellulären Viabilität von HEC-1A und hESC Zellen.

Für nachfolgende Experimente wurden die hier festgelegten Standardparameter der Plasmaaktivierung beibehalten. Diese umfassen einen Argon Gasfluss von 10 l/min, eine Frequenz von 6000 Hz, eine Amplitude von 40 %, einen Abstand zwischen Plasmaquelle und Flüssigkeitsoberfläche von 5 mm und die Aktivierung von 7 mL DMEM (Katalognummer: 41965-039; DMEM, *high glucose*) in einer 5 cm Zellkulturschale. Aktivierungszeiten und PAM-Verdünnungsstufen gelten hingegen als veränderbare Variablen, um stärkere PAM-induzierte Effekte zu erzielen.

3.2. Beurteilung PAM-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in Zelllinien

DNA-Doppelstrangbrüche sind häufig beschriebene Einflüsse direkter Plasmabehandlung auf die Integrität genomischer DNA (81, 168-170). Um PAM-Effekte auf die DNA-Integrität zu untersuchen, wurden HEC-1A Zellen mit 60 (Abb. 5a) und 120 (Abb. 5b) s aktivierten PAM für 4 h inkubiert.

Neben den effektiven Aktivierungszeiten wurden Verdünnungsstufen des PAMs verwendet, mit denen zuvor bereits ein signifikanter Effekt auf die Zellen nachgewiesen werden konnte: 1:8, 1:4, 1:1. Nach PAM-Behandlung wurden die Zellen PFA-fixiert und anschließend mit anti- γ H2AX spezifischen Antikörpern markiert. Die repräsentative IF-Mikroskopie der HEC-1A Zellen in 40-facher Vergrößerung und den angegebenen Plasmakonzentrationen ist für 60 (Abb.5a) und 120 (Abb.5b) s Aktivierungszeit dargestellt. Zur Bestimmung der relativen γ H2AX Area pro Zellkern wurden die Zellen zusätzlich mit DAPI gefärbt.

Als Positivkontrolle wurden HEC-1A Zellen verwendet, die für 2 h mit dem 1:1000 verdünnten Chemotherapeutikum Doxorubicin inkubiert wurden (Abb.5c).

Abbildung 3d zeigt die relative γ H2AX Area nach Behandlung mit 60 und 120 s aktiviertem PAM verglichen mit der Doxorubicin behandelten Positivkontrolle (Abb.5d). Bereits ab einer PAM-Verdünnungsstufe von 1:8 und sowohl für 60 als auch von 120 s Aktivierungszeit konnte ein signifikanter Anstieg der γ H2AX positiven Area pro Zellkern nachgewiesen werden (Aktivierungszeit: 60 s: Verdünnung: 1:8: 3,82-fold, $p=0,004$; 1:4: 7,89-fold, $p=0,004$; 1:1: 21,84-fold, $p=0,0002$; Aktivierungszeit: 120 s: Verdünnung: 1:8: 5,14-fold, $p=0,02$; 1:4: 44,58-fold, $p=0,0002$; 1:1: 46,14-fold, $p=0,002$; Doxorubicin: Verdünnung: 1:1: 56,91-fold, $p=0,0001$).

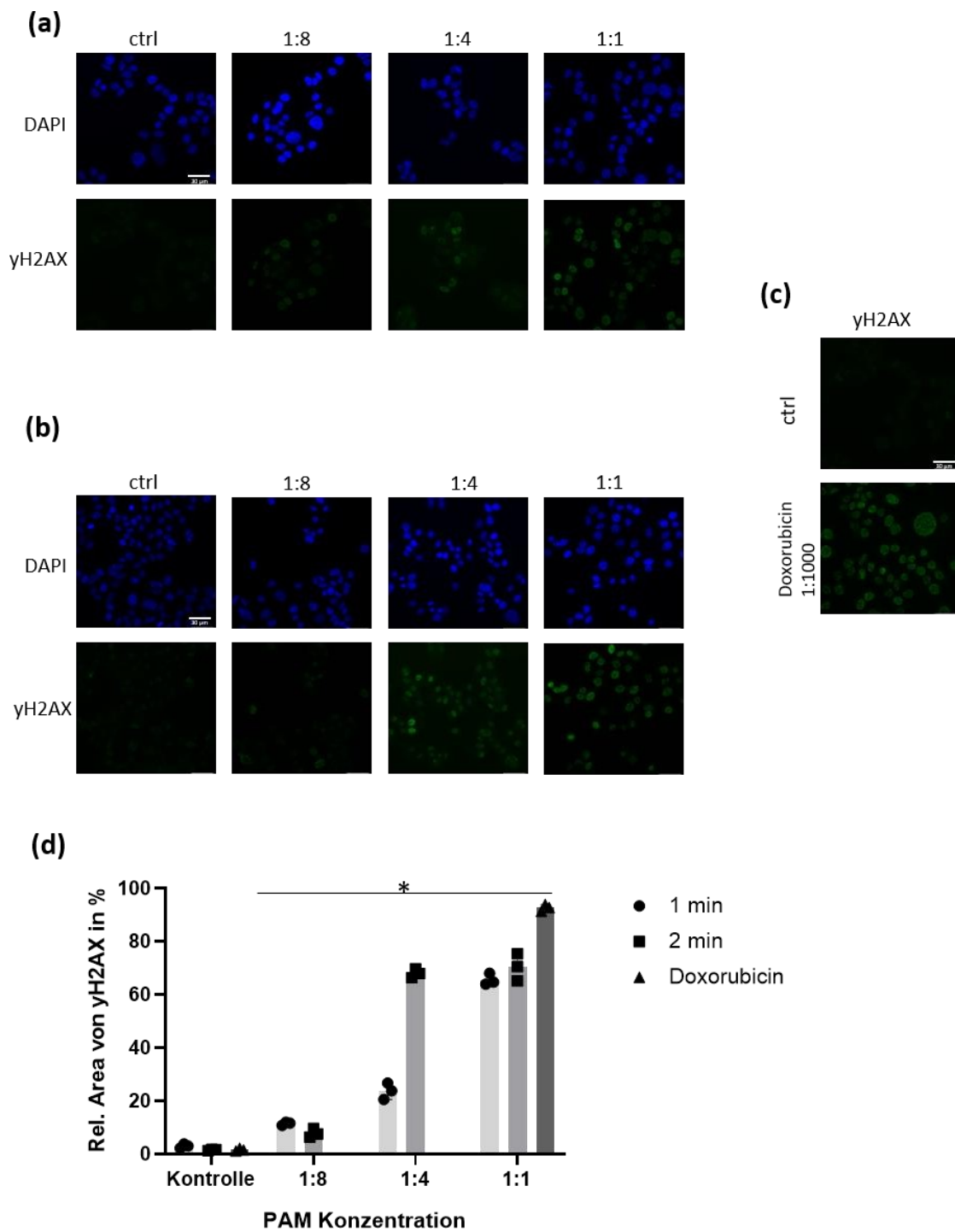


Abbildung 5: PAM-induzierte dsDNA Doppelstrangbrüche. (a,b) Repräsentative IF Mikroskopie der HEC-1A Zellen nach Behandlung mit angegebenen PAM-Verdünnungsstufen für die Aktivierungszeiten von 60 (a) und 120 (b) s nach PFA Fixierung und yH2AX Färbung. Die Positivkontrollen wurden 2 h mit 1:1000 Doxorubicin inkubiert (c). (d) Relative Area des yH2AX Signals in PAM und Doxorubicin behandelten HEC-1A Zellen normalisiert zu DAPI, also pro Zellkern verglichen zur Argonkontrolle. Die relative yH2AX Area wurde mit ImageJ kalkuliert. Die

Ergebnisse sind als Einzelwerte und Mittelwert \pm SD nach n=3 unabhängigen Experimenten dargestellt. *p < 0,05, bestimmt durch gepaarten Student's t-test.

3.3. Optimierung des Kulturmediums für die aus Patientenproben gewonnenen Endometrioseorganoide

Im nächsten Schritt der Arbeit wurden patientinnenspezifische Organoidsysteme zur Kultur von primärem Endometriosegewebe etabliert. Um optimale Wachstumsbedingungen zu ermöglichen, müssen die primären Endometrioseorganoide in einem Alternativmedium kultiviert werden verglichen mit den zuvor verwendeten 2D-Zellkulturmedium (siehe Material und Methoden). Zu den Bestandteilen dieses Mediums für Organoide gehören jedoch Antioxidantien, die die zytotoxischen Effekte des PAMs nachgewiesen abschwächen (110, 159, 167). Das Zellkulturmedium der Organoide (Standardmedium: SM) beinhaltet verglichen mit dem für 2D-Zellen verwendeten DMEM FCS (10%) antioxidativ wirksame Bestandteile wie *Sodium pyruvate* (Pyruvat), *B27 Supplement* und N-Acetylcystein (NAC) (159, 167, 171, 172). Um eine Wirkreduktion durch antioxidative Bestandteile des etablierten Standardmediums (SM) für Organoide zu vermeiden, galt es diese im Zeitraum der PAM-Behandlung zu ersetzen oder ersatzlos zu kürzen, ohne dass es Einfluss auf die Kultur der Organoide hat.

Für die Zusammensetzung des für die PAM-Behandlung optimierten Mediums (OM) wurde DMEM (Katalognummer: 41965-039; *DMEM, high glucose*) als Basis gewählt, welches im Gegensatz zu dem zuvor als Basis verwendeten *Advanced DMEM* ⁺⁺⁺ (mit P/S, GlutaMax und HEPES) kein Pyruvat enthält. Von B27 wurde eine Formulierung ohne Antioxidantien verwendet. NAC wurde aus der Mediumzusammensetzung gekürzt.

Auch konditioniertes Medium für die weitere Kultur der Organoide wurde mit DMEM als Basis etabliert (RN10) und mittels *Luciferase-Steady-Glo Assay* getestet. *Advanced DMEM* wurde außerdem bei der Probengewinnung und beim Passieren der Organoide durch DMEM ersetzt, wodurch keine Unterschiede bezüglich des Organoidwachstums festgestellt werden konnten.

Repräsentative mikroskopische Phasenkontrastaufnahmen zeigen primäre Endometrioseorganoide derselben Patientenprobe, die mit Standardmedium (SM) und optimiertem Medium (OM) kultiviert wurden (Fig.6). Es zeigten sich keine Unterschiede des Organoidwachstums zwischen konventionellem SM und dem für die PAM-Generierung etabliertem OM.

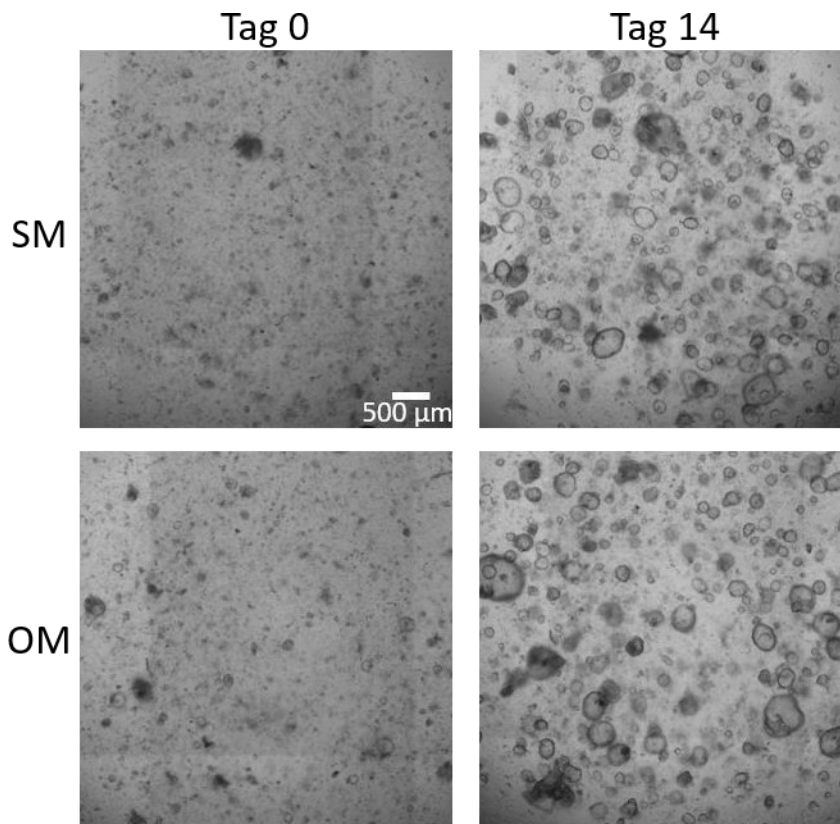


Abbildung 6: Entwicklung des optimierten Mediums der Endometrioseorganoide für PAM-Therapie. Exemplarische Gegenüberstellung von repräsentativen mikroskopischen Phasenkontrastaufnahmen derselben Endometrioseorganoidlinie kultiviert im Standardmedium (SM) für Organoide und im für PAM-Therapien optimiertem Medium (OM) am ersten Tag der Passage (Tag 0) und am letzten (Tag 14). Aufnahmen erfolgten mit dem EVOS-Mikroskop in 4-facher Vergrößerung.

3.4. Effekte verschiedener PAM-Konditionen auf die aus Patientenproben gewonnenen Endometrioseorganoide

Nach der Untersuchung der PAM abhängigen Reduktion der Zellviabilität in 2D kultiviertem Endometriosegewebe folgend, wurde im nächsten Schritt der Effekt unterschiedlicher Parameter der PAM-Generierung in primären 3D Endometrioseorganoiden analysiert.

3.4.1. Patientenkollektiv

Die nachfolgend aufgelisteten Gewebeproben von Patientinnen wurden als Organoide in OM kultiviert und in den folgenden Versuchen mit Plasma aktivierten Medium verwendet.

Tabelle 10

	Patientenalter	Endometriose Ursprung
Endometriose #1 (51)	33	parakolisch rechts
Endometriose #2 (53A)	38	Beckenwand rechts
Endometriose #3 (58B)	38	Blase
Endometriose #4 (58C)	38	Tube links

3.4.2. Untersuchung der Einflüsse auf das Organoidwachstum durch PAM

Die für die Behandlung der primären Endometrioseorganoide verwendeten PAM-Verdünnungsstufen wurden aus den Vorexperimenten mit HEC-1A (3.1.,3.2.) und hESC (3.1.) in 2D-Zellkultursystemen adaptiert. Die PAM-Behandlung der Endometrioseorganoide erfolgte entweder einen Tag nach dem Aussähen der Organoide in BME (Abb.7a,b) oder der Endometrioseeinzelnzellen noch vor dem Aussähen der Zellen in BME (Abb.7c). Für die Dokumentation des Wachstums der Endometrioseorganoide wurden Phasenkontrastaufnahmen der 48-Well Platten angefertigt (EVOS). Zur quantitativen Auswertung des Organoid Wachstums wurde per *ImageJ* der *fold-increase* der Organoide bestimmt (Abb.7a-c). Hierfür wurden in den Bildern der Organoide an Tag 0 und dem

letzten Tag der Passage jeweils die Durchmesser von 30 Organoiden manuell im μm bestimmt.

Zunächst wurden die Endometrioseorganoide für 4 h mit 120 s aktiviertem PAM in den Verdünnungsstufen 1:8, 1:4 und 1:1 behandelt (Abb.7a). Die repräsentativen Phasenkontrastaufnahmen der Endometrioseorganoide zeigen den Vergleich zwischen der Kontrolle und den mit der PAM-Verdünnungsstufe 1:1 behandelten Organoiden am letzten Tag der Passage (Tag 7) (Abb.7a). Daneben grafisch dargestellt der *fold-increase* von Tag 0-7 der mit unterschiedlichen PAM-Verdünnungsstufen behandelten Organoiden verglichen zur Kontrolle (Abb.7a). Im Ergebnis hatte die PAM-Behandlung unabhängig von den eingesetzten PAM-Verdünnungsstufen keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der primären Endometrioseorganoide.

Auch weitere alternierende Parameter der PAM-Generierung wie eine verlängerte PAM-Inkubationszeit von 8 und 24 h sowie verlängerte PAM-Aktivierungszeiten von 180 und 300 s als auch deren Kombination resultierte in keiner Hemmung des Wachstums der Endometrioseorganoide (Ergänzende Abb.2 a,b,c,d).

In einem folgenden Schritt wurden die Effekte einer PAM-Generierung mit einer alternativen Plasmaquelle *Atmospheric pressure plasma jet* (APPJ, KINPen med) auf das Wachstum primärer Endometrioseorganoide untersucht.

Variable Parameter wurden an die Versuche mit der DBD-Quelle angepasst: Abstand: 5 mm, DMEM Volumen 7 ml, Oberfläche 5 cm, Aktivierungszeit: 120 s, PAM Inkubationszeit: 24 h.

Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen (EVOS) der 1:1 PAM behandelten Endometrioseorganoide sowie der gemessene *fold-increase* verglichen mit der Argonkontrolle an Tag 0 und Tag 6 sind in Abbildung 7b dargestellt. Auch in diesem Versuchsaufbau konnte weder durch die DBD-Quelle, noch durch den APPJ ein signifikanter PAM-Einfluss auf das Wachstum (*fold-increase* Tag 0-6) primärer Endometrioseorganoide festgestellt werden (Abb.7b).

Da die bisher verwendeten Parameter zur PAM-Generierung, für die ein signifikanter Einfluss bezüglich der relativen Zellviabilität im 2D-Modell nachgewiesen werden konnte, auf die primären Endometrioseorganoide auch

nach deren Verstärkung keinen limitierenden Einfluss bezüglich des Organoidwachstums hatten, sollte im nächsten Schritt das verwendete Matrigel (BME) als abschwächender Faktor der Wirksamkeit des PAMs überprüft werden. Denn im Gegensatz zu 2D-Zellen werden die Endometrioseorganoide nach dem Splitten mit Matrigel ausgesät und wachsen eingebettet in dem tropfenförmigen Matrigel in ihrer 3D-Struktur.

Um das Matrigel als limitierenden Faktor der PAM-Wirksamkeit auszuschließen, wurden im Folgenden Versuch (Abb.7c) die Endometrioseorganoide gesplittet, mechanisch und enzymatisch zu Einzelzellen zerkleinert und vor dem Aussähen mit PAM behandelt, bevor sie mit Matrigel in Berührung kommen.

Die Einzelzellen wurden auf 0,5 ml Tubes aufgeteilt, sodass pro PAM-Verdünnungsstufe 13,5 µl Zellsuspension in den Tubes waren. Die verwendeten PAM-Verdünnungsstufen waren 1:4, 1:2 und 1:1 bei einer Aktivierungszeit von 180 s und einer Inkubationszeit von 4 h. Nach der PAM-Inkubation wurde die Endometriosezellen per Zentrifugation vom Zellkulturüberstand Zellsuspension getrennt und die Zellen wurden regulär in Matrigel ausgesät. Entsprechend der Vorversuche wurde das Organoidwachstum am letzten Tag der Passage (Tag 6) beurteilt. Abbildung 7c zeigt die repräsentative Phasenkontrastmikroskopie und zugehörige *fold-increases* der ohne Zusatz von BME behandelten Endometrioseorganoide (Tag 6, PAM-Verdünnungsstufe 1:1) verglichen mit der Argonkontrolle.

Kongruent zu den Vorversuchen konnte die PAM-Behandlung auch ohne BME-Zusatz keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum primärer Endometrioseorganoide nachgewiesen werden.

Dieser fehlende Einfluss kann auf Verschiedenes zurückgeführt werden, was im Folgenden durch weitere Versuche eingegrenzt werden soll. Die Möglichkeit molekularer Effekte induziert durch PAM verglichen zu unbehandelten Kontrollen, Limitationen der Therapie aufgrund des 3D-Organoid-Modells generell und auch das optimierte Organoidmedium als limitierender Faktor auf die PAM-Behandlung werden im Nachfolgenden weiter untersucht (4.4.3,4.5.).

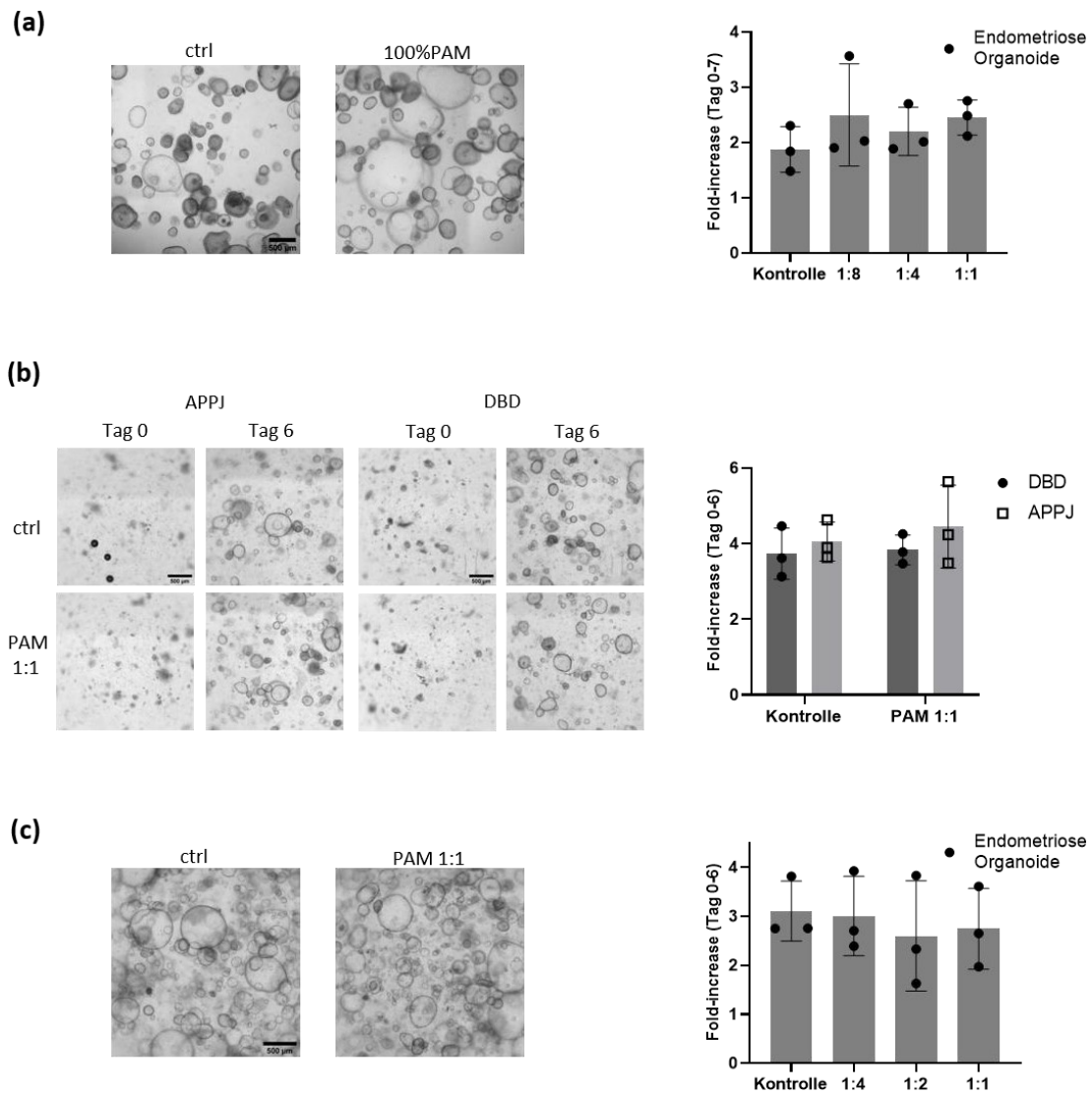


Abbildung 7: Effekte verschiedener Parameter der PAM-Generierung und unterschiedlicher PAM-Verdünnungsstufen auf das Wachstum primärer Endometrioseorganoide. (a) Fold-increase des Wachstums primärer Endometrioseorganoide nach 4 h PAM-Inkubationszeit mit 120 s aktiviertem PAM (DBD-Quelle) in angegebenen PAM-Verdünnungsstufen. (b) Fold-increase der aus Patientenproben gewonnenen Endometrioseorganoiden nach 24 h Inkubationszeit mit 120 s aktiviertem PAM unter Verwendung verschiedener NIPP Geräte. (c) Fold-increase des Wachstums primärer Endometrioseorganoide nach 4 h PAM-Behandlung der Endometrioseeinzellen vor der Aussaat in BME und Formation der Endometrioseorganoide mit 180 s aktiviertem PAM (DBD-Quelle). Fold-increases wurden als Mittelwert der Durchmesser manuell ausgezählter Organoide (30 pro Bild) an Tag 0 und dem letzten Tag der Passage in μm durch die Verwendung von ImageJ kalkuliert. Die Ergebnisse sind als Einzelwerte und Mittelwert \pm SD nach $n=3$ unabhängigen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$, bestimmt durch gepaarten Student's t-test.

3.4.3. PAM-Effekte auf zelluläre Struktur- und Proliferationsmarker sowie DNA-Doppelstrangbrüche in primären Endometrioseorganoiden.

Makroskopisch resultierte die PAM-Behandlung von Endometrioseorganoiden in keinen Veränderungen des Organoidwachstums. Im nächsten Schritt wurde ein möglicher PAM-Effekt auf verschiedene zelluläre Struktur- (Zytokeratin) und Proliferationsmarker (Ki67 und p53) sowie DNA-Doppelstrangbrüche (yH2AX) untersucht. Primäre Endometrioseorganoiden wurden für 24 h mit 180 s aktiviertem PAM (1:1) inkubiert, nach 24 oder 72 h mit PFA fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Zytokeratin, Ki67, p53 und yH2AX gefärbt (Abb.8).

Zunächst wurde ein spezifischer Antikörper gegen Zytokeratin (anti-Zytokeratin-Antikörper; MA5-28561; Invitrogen) verwendet, um den epithelialen Ursprung der Endometrioseorganoiden zu charakterisieren (Abb.8).

Wie bereits in Abschnitt 3.2. in 2D Zellkultur durchgeführt, wurden auch in den primären Endometrioseorganoiden die mögliche Induktion von DNA-Doppelstrangbrüche durch PAM mittels spezifischer Antikörper gegen yH2AX (anti-yH2AX-Antikörper; 05-636; Upsate) untersucht (Abb.8). Als antiproliferativer Marker für Apoptose- und Zellzyklusarrest wurde p53 (anti-p53- Antikörper; SC-126; Santa Cruz), als Proliferationsmarker Ki67 (anti-Ki67- Antikörper; 16667; Abcam) antikörpergefärbt (Abb. 8).

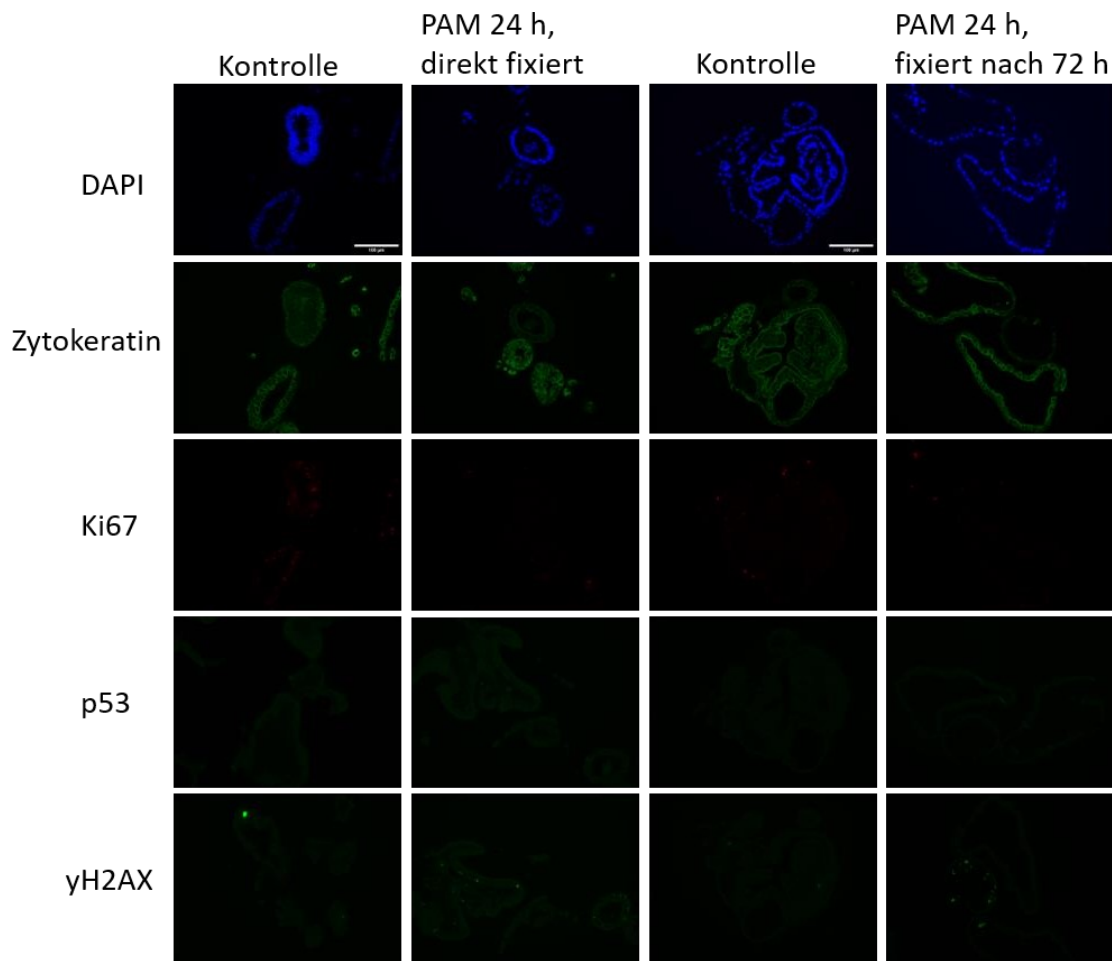


Abbildung 8: PAM-Effekte auf verschiedene Faktoren der Zellstruktur und -proliferation sowie induzierte DNA Doppelstrangbrüche in primären Endometrioseorganoiden. Repräsentative IF-Mikroskopie der PFA-fixierten Endometrioseorganoiden nach 24-stündiger PAM-Behandlung mit 100 % PAM verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Endometrioseorganoiden und entsprechende Kontrollen wurden direkt nach PAM-Behandlung fixiert und nach 72 h.

Weder nach 24 noch 72 h wurde ein erkennbarer Unterschied der Expression o.g. Faktoren nach PAM-Behandlung nachgewiesen werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.4.2. zeigen neben dem fehlenden Einfluss auf das Organoidwachstum weder Faktoren der Zellstruktur und -proliferation eine veränderte Expression nach PAM-Behandlung, noch werden DNA-Doppelstrangbrüche induziert.

3.5. Dosisabhängige PAM-Effekte auf Organoide aus Endometriumkarzinomzelllinien

Zur Überprüfung, ob die Verwendung des Organoidmodells an sich Grund für die fehlenden Effekte auf die aus Patientengewebe gewonnenen Endometrioseorganoide darstellt, wurden im Folgenden die bereits für 3.1. und 3.2. verwendete Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1A als Organoidmodell kultiviert.

Im nächsten Schritt wurden PAM-Effekte in malignen Endometriumkarzinomorganoiden basierend auf HEC-1A Zellen untersucht. Zunächst wurden 2.000 HEC-1A Zellen per Well in Matrigel ausgesät und für 72 h in DMEM FCS (10 %) (Abb.9a,b) und optimiertem Organoidmedium (OM) (Abb.9c,d) kultiviert. Daraufhin wurden die HEC-1A Organoide mit 180 s aktiviertem PAM in den Verdünnungsstufen 1:4, 1:2 und 1:1 für 8 und 24 h inkubiert. Nach der PAM-Inkubation wurden die HEC-1A Organoide bis zum Zeitpunkt von 144 h nach Zellaussaat in DMEM FCS (10%) (Abb.9a,b) und optimiertem Organoidmedium (OM) (Abb. 9c,d) kultiviert. Die relative zelluläre Viabilität wurde 144 h nach Zellaussaat per *CellTiterGlo Assays* bestimmt.

Für eine Inkubationszeit von 8 h konnte ein signifikanter Einfluss auf die relative Zellviabilität in den mit DMEM FCS (10%) kultivierten HEC-1A ab einer PAM-Verdünnungsstufe von 1:2 nachgewiesen werden (Abb.9b), wohingegen bei den im OM kultivierten Organoiden keine Signifikanz festgestellt werden konnte (Abb.9d) (Inkubationszeit: 8 h: DMEM FCS (10%): Verdünnung: 1:2: 1,34-fold, $p=0,03$; 100%: 34,24-fold, $p=0,0002$).

Bei einer Inkubationszeit von 24 h wurde für beide Medien ein signifikanter PAM-Effekt bei einer PAM-Verdünnungsstufe von 1:1 nachgewiesen (Abb.9b,d) (Inkubationszeit: 24 h: DMEM FCS (10%): Verdünnung: 1:1: 23,17-fold, $p=0,002$; OM: Verdünnung: 1:1: 12,71-fold, $p=0,03$).

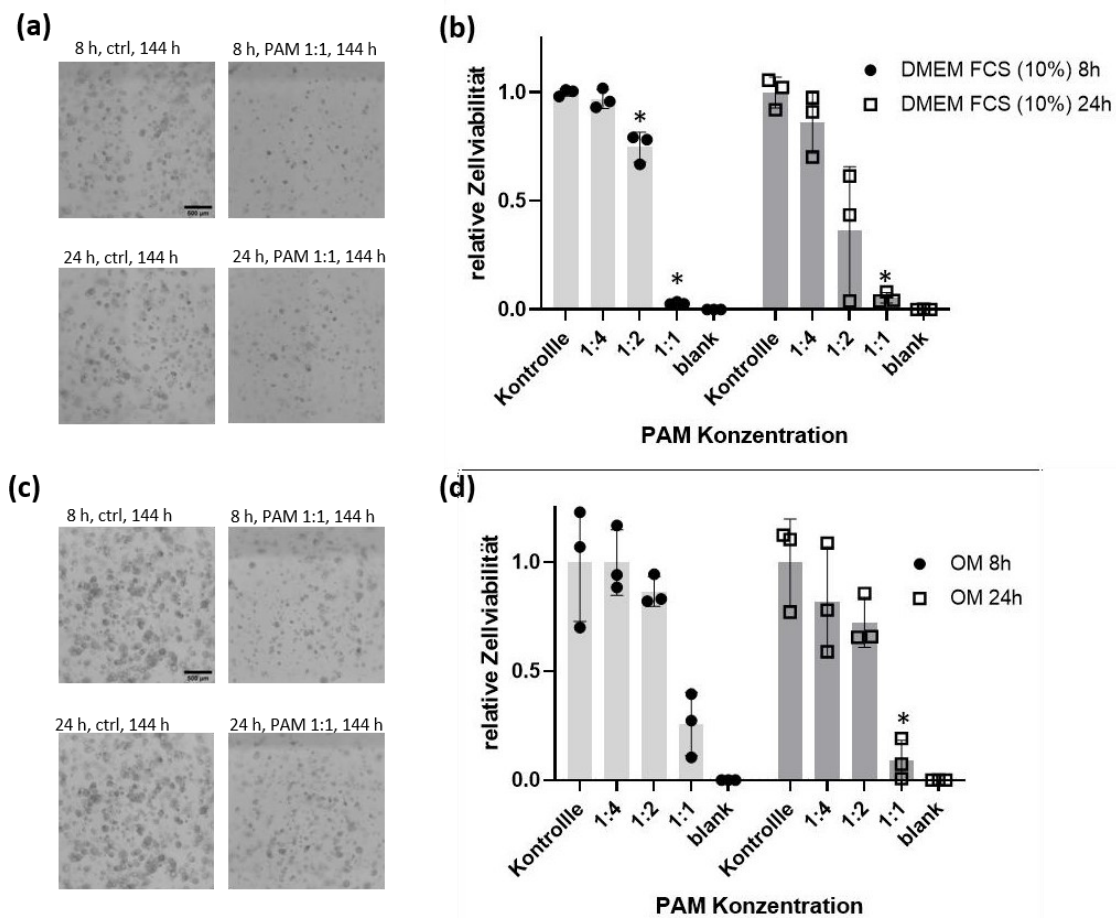


Abbildung 9: PAM-Behandlung von HEC-1A Organoiden. HEC-1A Organoide wurden 144 h nach dem Aussäen und 72 h nach der Inkubation für 8 und 24 h mit 180 s aktiviertem PAM in den angegebenen Verdünnungsstufen mit dem EVOS Mikroskop analysiert (a,c). Repräsentative Phasenkontrastmikroskopie von HEC-1A Organoiden kultiviert in DMEM FCS (10%) (a) und optimiertem Organoidmedium (OM)(c). (b,d) Relative zelluläre Viabilität von HEC-1A Organoiden per CellTiterGlo Assay kultiviert in DMEM FCS (10%) (a) und optimiertem Organoidmedium (OM) (c). Die Ergebnisse sind als Einzelwerte und Mittelwert \pm SD nach $n=3$ unabhängigen Experimenten dargestellt. * $p < 0,05$, bestimmt durch gepaarten Student's t-test.

Um Einflüsse des bereits in 3.4 für die Organoidkultur verwendeten OM auf die Wirksamkeit von PAM auszuschließen, wurden im nächsten Schritt HEC-1A sowie ISHIKAWA Endometriumkarzinomzellen als 3D-Organoidsysteme kultiviert und mit unterschiedlichen PAM-Verdünnungsstufen behandelt.

HEC-1A und ISHIKAWA Organoide wurden zunächst für 72 h in DMEM FCS (10%) kultiviert und anschließend für 8 und 24 h mit 180 s aktiviertem PAM in verschiedenen Verdünnungsstufen inkubiert. Anschließend wurden die

Organoide jeweils in DMEM FCS (10%) oder OM weiter kultiviert und nach 144 h per *CellTiterGlo Assay* analysiert.

Abbildung 10a,c,e,g zeigt die repräsentative Phasenkontrastmikroskopie von HEC-1A und ISHIKAWA Organoiden nach Behandlung mit 1:1 PAM verglichen mit der Argonogaskontrolle und Kultivierung in DMEM FCS (10%) und OM dargestellt sowie in der rechten Spalte (Abb.10b,d,f,h) die statistische Auswertung mit Darstellung der relativen Zellviabilität.

Ein signifikanter Einfluss konnte bei den HEC-1A Organoiden mit 8 h Inkubationszeit für in DMEM FCS (10%) kultivierte ab 1:4 PAM-Therapie und bei denen im OM ab 1:2 PAM-Therapie aufgezeigt werden (Abb.10a,b) (Inkubationszeit: 8 h: DMEM FCS (10%): Verdünnung: 1:4: 1,11-fold, $p=0,04$; 1:2: 3,07-fold, $p=0,04$; 1:1: 8,87-fold, $p=0,002$; OM: Verdünnung: 1:2: 2,73-fold, $p=0,03$; 1:1: 19,55-fold, $p=0,002$).

Ein signifikanter Einfluss konnte bei den HEC-1A Organoiden mit 24 h Inkubationszeit für in DMEM FCS (10%) kultivierte ab 1:4 PAM-Therapie und bei denen im OM ab 1:2 PAM-Therapie (Abb.10c,d) (Inkubationszeit: 24 h: DMEM FCS (10%): Verdünnung: 1:4: 1,13-fold, $p=0,047$; 1:2: 3,92-fold, $p=0,001$; 1:1: 11,92-fold, $p=0,0005$; OM: Verdünnung: 1:2: 4,07-fold, $p=0,002$; 1:1: 46,08-fold, $p=0,0002$).

Hier hatte die höhere Inkubationszeit also keinen signifikant erhöhten Effekt bezüglich der relativen Zellviabilität der HEC-1A Organoide.

Die ISHIKAWA-Organoide reagierten insgesamt stärker auf den Einfluss des PAMs. Bei einer Inkubationszeit von 8 h konnte für in DMEM FCS (10%) kultivierte ab 1:2 PAM-Therapie und bei denen im OM ab 1:4 PAM-Therapie eine Signifikanz bezüglich des Einflusses von PAM auf die relative Zellviabilität festgestellt werden (Abb.10e,f) (Inkubationszeit: 8 h: DMEM FCS (10%): Verdünnung: 1:2: 15,65-fold, $p=0,009$; 1:1: 16,49-fold, $p=0,01$; OM: Verdünnung: 1:4: 21,5-fold, $p=0,01$; 1:2: 35,35-fold, $p=0,02$; 1:1: 47,26-fold, $p=0,02$).

Bei 24 h Inkubationszeit für beide Medien bereits ab einer PAM-Verdünnungsstufe von 25 % (Abb.10g,h) (Inkubationszeit 24 h: DMEM FCS (10%): Verdünnung: 1:4: 8,57-fold, $p=0,002$; 1:2: 17,44-fold, $p=0,005$; 1:1: 14,4-

fold, $p=0,006$; OM: Verdünnung: 1:4: 18,47-fold, $p=0,004$; 1:2: 30,59-fold, $p=0,005$; 1:1: 31,1-fold, $p=0,005$).

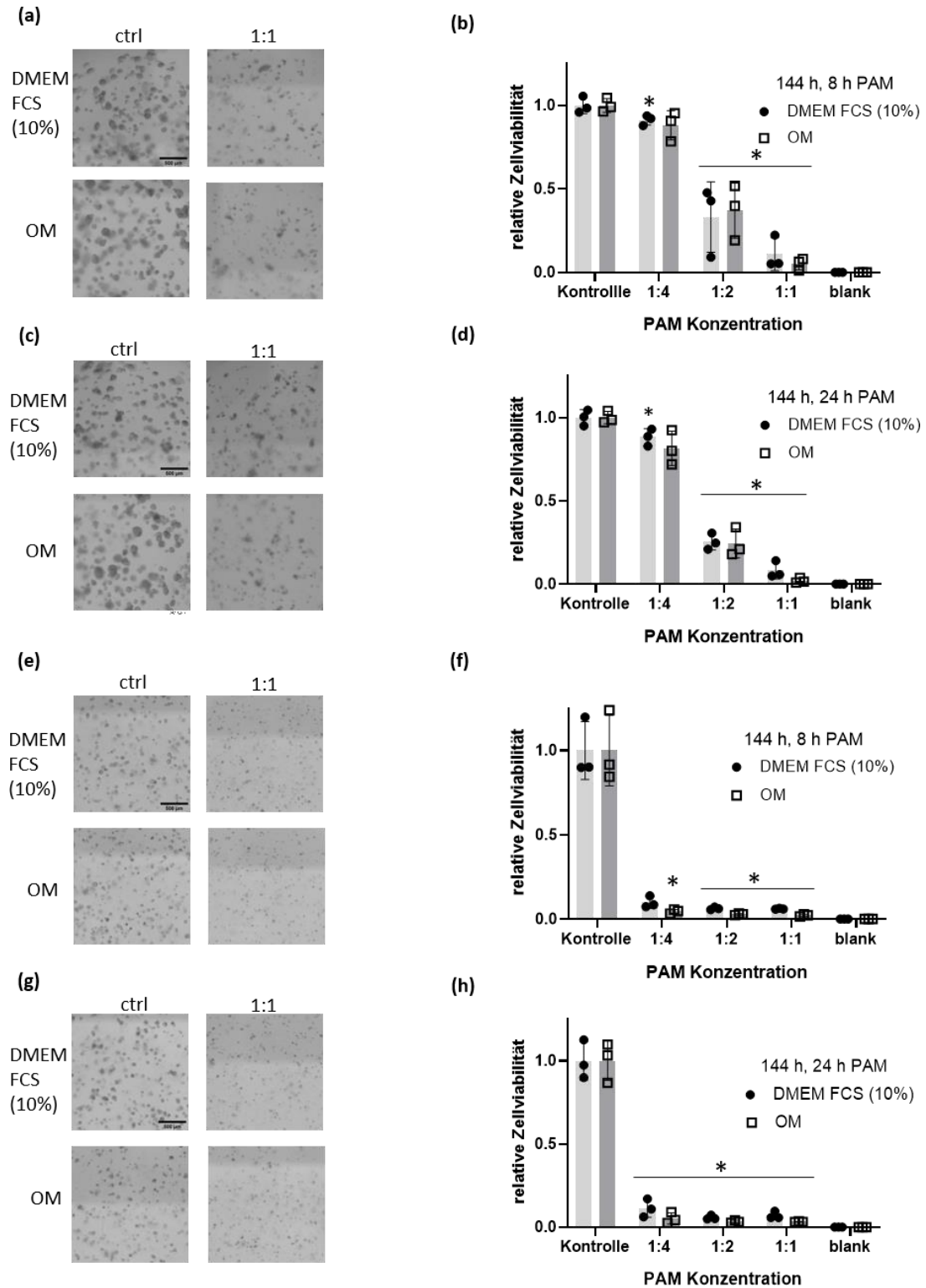


Abbildung 10: Ausschluss der Effekte des Kulturmediums auf die Wirksamkeit der PAM-Behandlung von HEC-1A und ISHIKAWA im Organoid Modell. Repräsentative

Phasenkontrastmikroskopie (Verwendung des EVOS Mikroskops) und relative Zellviabilität (Verwendung des CellTiterGlo Assays) von HEC-1A (a-d) und ISHIKAWA (e-h) als Organoid Modell kultiviert in DMEM FCS (10%) für 72 h. 72 h nach dem Aussähen wurden die Organoide für 8 h (a,b,e,f) und 24 h (c,d,g,h) mit 180 s aktiviertem PAM und angegebenen Konzentrationen inkubiert und daraufhin entweder in DMEM FCS (10%) oder OM weiter kultiviert. Die Ergebnisse sind als Einzelwerte und Mittelwert \pm SD nach n=3 unabhängigen Experimenten dargestellt. *p < 0,05, bestimmt durch gepaarten Student's t-test.

Anhand dieser Ergebnisse konnte aufgezeigt werden, dass der zuvor entstandene Eindruck, das OM schwäche den Effekt des PAMs vor allem bei einer Inkubationszeit von 8 h (Abb.7b,d) deutlich ab, auf das vorherige stärkere Wachstum der Zellen im OM zurückzuführen war. Unter den soeben erläuterten Konditionen wurde die Vergleichbarkeit der relativen Zellviabilität nach PAM-Behandlung der Organoide in beiden Medien verbessert. Und es konnte aufgezeigt werden, dass das OM keinen starken Einfluss bezüglich der Effektivität der PAM-Therapie von Organoiden besitzt.

Außerdem wurde gezeigt, dass die PAM-Behandlung im 3D-Endometriumkarzinommodell eine signifikante Reduktion der Zellviabilität bewirkt. Dieser PAM-Effekt konnte in aus Patientenproben kultivierten Endometrioseorganoiden nicht nachgewiesen werden. Daher muss bezüglich PAM-Behandlung von gewebespezifischer bzw. malignitätsselektiver Wirksamkeit ausgegangen werden.

4 Diskussion

4.1. Methodik

4.1.1. PAM-Generierung

Im Folgenden wird die in der Studie verwendete Methodik der PAM-Generierung unter Berücksichtigung der bis dato veröffentlichten Literatur im Hinblick auf die Effektivität bei einer Behandlung generell und vor allem im 3D-Modell analysiert. Dabei wird die Dauer der Lagerung des PAMs, die Aktivierungszeit, die Menge der aktivierten Flüssigkeit in der Petrischale, Abstand zwischen Plasmaquelle und Flüssigkeitsoberfläche und die Menge der verwendeten Zellen berücksichtigt.

Das verwendete PAM wurde direkt nach Aktivierung zur Behandlung der 2D-Zelllinien und Organoide appliziert. Folglich betrug die Dauer der Lagerung etwa 5 min. In vorherigen Studien wurde bewiesen, dass PAM bis zu 7 Tage ohne Wirkverlust im Kühlschrank gelagert werden könne (101, 119). Jedoch zeigten Judeé et al., dass die PAM induzierte Wachstumsinhibition der HCT 116 Kolon Adenokarzinom *multicellular tumor spheroids* (MCTS) von der Transferierungszeit des PAMs nach Generierung auf die Spheroide abhing. Bei kurzen Transfer Zeiten (1 h oder 14 h) wurde das Wachstum um etwa 40 % verglichen zu Kontrollen gehemmt, wohingegen bei längeren Zeiten (24 h oder 48 h) nur um 20% (158). Diese Resultate indizieren, dass die hier verwendete kurze Lagerung von etwa 5 min des PAMs nach Generierung dessen zytotoxischen Effekte vor allem auf die 3D-Zellen verstärkten.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der bei der Effektivität des generierten PAMs zu beachten ist, ist die Aktivierungszeit der Flüssigkeit (173). Bei den Zelllinien HEC-1A und hESC kultiviert in 2D induzierte PAM effektiv Apoptose, nachdem es 60, 90 und 120 s aktiviert worden war. Bei den HEC-1A und ISHIKAWA Zelllinien kultiviert als Organoide wurde, nach fehlenden Resultaten der PAM-Behandlung bei Endometrioseorganoiden, eine Aktivierungszeit des PAMs von 180 s verwendet. Dabei wurde der signifikante Apoptose-induzierende Effekt der PAM-Therapie auf die HEC-1A und ISHIKAWA Organoide nachgewiesen.

Generell wurde gezeigt, dass sich die Menge an RNS und H_2O_2 in PAM mit Verlängerung der Aktivierungszeit erhöht-in diesem Fall 0,5 bis 2 Minuten- und damit auch dessen Einfluss auf die Zellen (173).

Der signifikante Einfluss der verwendeten Aktivierungszeiten von 60 und 120 s in der PAM-Behandlung von HEC-1A und hESC kultiviert in 2D, wurde ebenfalls in einer anderen Studie bei Behandlung von immortalisierten „stromal cells“ und ISHIKAWA nachgewiesen (137). Auch bei dem bisher selten untersuchten Einfluss von PAM auf 3D-Zellmodelle wurden Aktivierungszeiten zwischen 30 und 240 s verwendet (158, 161). Hierbei wurde der PAM induzierte DNA-Schaden auf die MCTS durch längere Aktivierungszeiten wie 120 und 240 s verglichen zu 60 s erhöht (158). Daraus lässt sich schließen, dass obwohl die in der eigenen Studie verwendete Aktivierungszeit von 180 s bei HEC-1A und ISHIKAWA effektiv Apoptose induzierte, eine längere Aktivierungszeit die Effektivität des PAMs in diesem Organoid-Modell noch verstärken könnte. Bei dem aus Patientenproben gewonnenen Endometriose-Organoiden konnte PAM-Aktivierungszeit-unabhängig (180-300 s) kein Effekt erzielt werden.

Die Anzahl der zu behandelnden Zellen ist bei der PAM-Applikation ebenfalls zu beachten. HEC-1A wurde kultiviert als Organoid-Modell mit 2000 Zellen per Well ausgesät und mögliche Einflüsse des Organoid Mediums auf die PAM-Effektivität sollten evaluiert werden. Dafür wurde eine Gruppe über das gesamte Experiment im Organoid Medium kultiviert und die andere mit DMEM FCS (10%), was für das 2D-Modell als Kulturmedium benutzt wird. Die Ergebnisse erweckten zunächst den Eindruck, als sei die PAM-Therapie bei Verwendung des Organoid Mediums weniger wirksam. Jedoch zeigten die auflichtmikroskopischen Aufnahmen der Organoide in 4-facher Vergrößerung, dass die HEC-1A Organoide vor der PAM-Therapie Zell-reicher, also schnelleres Wachstum aufwiesen als die in DMEM FCS (10%) kultivierten. Statt auf das Medium wurde der geringere Einfluss von PAM auf die höhere Zellzahl vor Beginn der Plasma-Therapie zurückgeführt. Diese Vermutung bestätigte sich mit dem nachfolgenden Experiment (vgl. Abb.10). Folglich hängt die Kapazität von PAM im 3D-Modell ebenfalls von der Konfluenz der Zellen vor Beginn der Therapie ab. Mit steigender Zelldichte,

verringert sich die PAM-Kapazität, was im Rahmen von 2D-Experimenten ebenfalls bereits bewiesen wurde (173).

Für die Generierung des PAMs wurde ein Abstand zwischen Plasmaquelle und Flüssigkeitsoberfläche von 0,5 cm gewählt und es wurden 7 mL DMEM in einer Petrischale mit einem Durchmesser von 5 cm aktiviert. Mit derselben wurde ebenfalls effektiv wirksames PAM zur Behandlung von immortalisierten „endometrial stromal cells“ und ISHIKAWA generiert (137). In einer vergangenen Studie wurde bereits mit zwei unterschiedlichen Magenkarzinom Zelllinien erforscht, inwiefern sich der Abstand auf die Wirksamkeit des PAMs auswirkt. Dabei kam man zu dem Ergebnis, dass bei dem ebenfalls verwendeten Abstand von 0,5 cm das PAM nach kürzerer Aktivierungszeit und in höherer Verdünnung effektiver wirkte als bei einem Abstand von 0,9 oder 1,4 cm (174). Die Akkumulation der reaktiven Spezies in der Flüssigkeit veränderte sich mit der Veränderung des Abstandes (173, 175). Der Einfluss auf die Wirksamkeit durch Variation des Abstandes zwischen Plasmaquelle und Medium wurde in dieser Studie nicht weiter untersucht, sondern dieser wurde anhand von bereits erhobenen Daten ausgewählt (85, 169, 176). Der für diese Studie verwendete Abstand zwischen Plasmaquelle und Flüssigkeitsoberfläche (0,5 cm) erwies sich sowohl im 2D- als auch im 3D-Zellmodell als effektiv. Zudem wurde nachgewiesen, dass mit geringeren Mengen zu aktivierender Flüssigkeit wie 3 und 6 mL stärker wirksames PAM generiert werden konnte als bei 12 oder 24 mL (174). Was sich wohl auf die in einer anderen Studie nachgewiesenen Abnahme der RONS in der Flüssigkeit mit zunehmenden Volumen dieser zurückführen lässt (173).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass durch die verwendeten Einstellungen zur Generierung des PAMs eine effektive Behandlung von den 2D-Zelllinien HEC-1A und hESC und den 3D-Organoidmodell HEC-1A und ISHIKAWA erzielt wird. Die Methodik deckt sich ebenfalls mit der derzeitigen Literatur zur Generierung von möglichst effektivem PAM.

4.1.2. Medium

Die zytotoxischen Effekte des PAMs werden durch Antioxidantien abgeschwächt, auch wenn diese als Bestandteile des Zellkulturmediums verwendet werden (110, 159, 167). Das Zellkultur Medium der Organoide beinhaltet verglichen mit dem für 2D-Zellen verwendeten DMEM FCS (10%) antioxidativ wirksame Bestandteile wie „Sodium pyruvate“, B27 und N-Acetylcystein (159, 167, 171, 172). Diese Tatsache wurde bereits in einer vorherigen Studie mit NIPP und Organoiden als mögliche Ursache einer höheren RONS-Dosis, die benötigt wurde, um das Wachstum der Organoide zu hemmen, genannt (167). Die aus Patienten Proben gewonnenen Endometrioseorganoide wurden zunächst in dem ursprünglichen Medium (SM) kultiviert (vgl. Abb.6 und Tabelle 4). Um jedoch eine möglichst effektive PAM-Behandlung ohne abschwächende Wirkung durch die im Medium vorhandenen Antioxidantien zu erzielen, wurde das Medium optimiert, indem man die Antioxidantien ersetzte oder wegließ (OM, vgl. Abb.6 und Tabelle 4). Die Veränderung der Mediumzusammensetzung hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Organoide (vgl. Abb.6). Als zu aktivierende Flüssigkeit wurde DMEM (Katalognummer: 41965-039; *DMEM, high glucose*) verwendet, welches ebenfalls keine zusätzlichen Antioxidantien beinhaltet. Somit wurden beeinflussende Faktoren vor der Behandlung der Endometrioseorganoide möglichst ausgeschlossen. Jedoch erfolgte nach ausbleibendem Effekt des PAMs auf die Endometrioseorganoide noch ein Vergleich der Einflüsse des OM und DMEM FCS (10%), welches als Zellkulturmedium für die effektiv mit PAM behandelten 2D-Zellen verwendet wurde (vgl. Abb.10). Hierfür wurden die HEC-1A und ISHIKAWA Organoide jeweils in beiden Medien kultiviert und unter denselben Behandlungen mit PAM therapiert (vgl. Abb.10). Die PAM-Behandlung verursachte ab einer 50%igen Konzentration bei beiden Medien eine signifikante Abnahme der Zellviabilität der HEC-1A und ISHIKAWA Organoide. Somit wurden starke Einflüsse des optimierten Organoid-Mediums (OM) auf die PAM-Therapie ausgeschlossen und waren nicht ursächlich für die ausbleibenden Effekte des PAMs auf die aus Patientenproben gewonnenen Endometrioseorganoide.

4.2.Übertragbarkeit der PAM-Konditionen von 2D auf 3D

Behandlungen mit NIPP sowohl direkt als auch indirekt sind unter Verwendung von 2D-Zellmodellen bereits in den unterschiedlichsten Bereichen der Medizin fester Bestandteil der Forschung (79, 100, 101, 122, 124). Auch die in der vorliegenden Studie verwendeten HEC-1A und hESC-Zelllinien wurden bereits in vergangenen Studien erfolgreich mit PAM behandelt und dessen Wirkungsweisen weiter erforscht (110, 137). Die hESC-Zelllinie wurde von den Autoren jedoch im Gegensatz zu dieser Studie noch weiter modifiziert (137, 177, 178).

Im nächsten Schritt bezüglich einer zukünftigen klinischen Anwendbarkeit der NIPP-Therapie *in-vivo* befassen sich einige Studien mit der NIPP-Therapie eines 3D-Zellmodells wie Spherioide und Organoide (158-161, 167, 179). Auch diese Studie befasste sich mit der Etablierung eines wirksamen Goldstandards der PAM-Behandlung im 2D-Zellmodell und mit dem Versuch dieses auf aus Patientenproben gewonnene Endometrioseorganoide und auf aus den Endometriumkarzinomzelllinien HEC-1A und ISHIKAWA kultivierte Organoid-Modelle zu übertragen (vgl. Abb.3-10). Mit der Entwicklung von NIPP-Behandlungen im 3D-Zellmodell gelingt eine bessere Übertragbarkeit auf die *in-vivo* Situation, da die häufig verwendeten 2D-Zellmodelle das Tumor Mikroenvironment, physiologische und strukturelle Unterschiede nicht abdecken und somit mit diesem Modell entwickelte Therapien womöglich das Zellwachstum *in-vivo* nicht verhindern (160, 180). Wohingegen das 3D-Modell den Abstand zum physiologischen Gewebe verringert und die physiologische Relevanz von Zell-basierten Assays verbessern kann (181). Auch bezüglich der Übertragbarkeit von NIPP-Therapieansätzen von einem 2D-Zellmodell auf ein 3D-Zellmodell gab es schon vor der durchgeführten Studie Vergleiche anderer Zelllinien wie die „*Head and Neck cancerous cells (FaDu)*“(161). In vergangenen Studien wurde aufgezeigt, dass eine einzelne effektiv zytotoxische Plasmabehandlung in 2D bei Anwendung auf ein menschliches Glioblastom Spheroid-Modell nicht suffizient war (160). Was in Folgestudien dieser Arbeitsgruppe zur Verwendung eines anderen Plasmageräts als in 2D und einer direkten NIPP-Therapie führte, welche auf ein MCTS-Modell erfolgreich wirkte

(179). Bei einer weiteren PAM-Behandlung, deren zytotoxischer Effekt zunächst in 2D kultivierten „*Head and Neck FaDu Cancerous Cells*“ nachgewiesen wurde, waren vier hintereinander folgende PAM-Behandlungen derselben Zelllinie als 3D-Spheroid kultiviert nötig, um erneutes Wachstum zu inhibieren (161). Diese Unterschiede in der Wirksamkeit von NIPP-Behandlungen zwischen 2D und 3D-Spheroids wurde mit der verlängerten Diffusionsstrecke in die Spheroide und veränderte intrazelluläre ROS-Level und Aktivität der antioxidativen Enzyme während der Spheroid-Entwicklung erklärt (161, 179). In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die PAM-Behandlung für HEC-1A Zellen in 2D entwickelt, bei der ein zytotoxischer Effekt auf die Zellen durch Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und anschließender Apoptose erfolgte (vgl. Abb.3-5). Die Ergebnisse zeigten, dass die Wirksamkeit des PAMs auf die Zellen dabei abhängig von der Aktivierungszeit, Inkubationszeit und Konzentration des PAMs ist. Bei den in 2D kultivierten HEC-1A Zellen zeigte sich ein signifikanter Effekt der PAM-Behandlung mit einer 4-stündigen Inkubationszeit, einer Aktivierungszeit von 60 s und einer PAM-Verdünnungsstufe von 1:8-1:4 und höher oder einer Aktivierungszeit von 120 s und einer PAM-Verdünnungsstufe von 1:8 und höher. Dieselbe Zelllinie wurde als 3D-Organoid-Modell kultiviert und anschließend mit PAM behandelt. Beeinflussende Faktoren des Organoidmedium (182) wurden dabei ausgeschlossen (vgl. Abb.10), was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglicht. Um signifikant zytotoxische Effekte in derselben Zelllinie in Organoid-Kultur durch die PAM-Behandlung zu erreichen, war eine Aktivierungszeit von 180 s, eine Inkubationszeit von 8 h und eine PAM-Verdünnungsstufe von 1:2 und höher nötig. Die Ergebnisse unserer eigenen Studie bezüglich der PAM-Behandlung der Zellen in einer 2D-Kultur verglichen zum 3D-Organoid-Modell decken sich mit denen der Literatur insofern, dass sich die NIPP-Behandlungsstrategien, entwickelt durch Verwendung von 2D-Zellkulturen, nicht auf das Organoid-Modell übertragen lassen. Zwar wurden effektiv zytotoxische PAM-Behandlungen für die Endometriumkarzinomzelllinien HEC-1A und ISHIKAWA im Organoid-Modell entwickelt, jedoch erforderte dies eine längere Aktivierungszeit, Inkubationszeit und niedrigere PAM-Verdünnungsstufen als in 2D. Dadurch ergibt sich die Schlussfolgerung einer

ebenfalls fehlenden Übertragbarkeit von in 2D erhobenen Studienergebnissen auf eine *in-vivo* Situation. Die Ergebnisse betonen die Notwendigkeit vermehrter Studien von NIPP-Therapien *in-vitro* mit Organoiden, um zukünftig eine bessere Übertragbarkeit solcher Therapien auf *in-vivo* zu gewährleisten.

4.3. Ausbleibende Wirkung von PAM auf Endometrioseorganoide

4.3.1. Evaluation der Limitationen indirekter NIPP-Therapie von Endometriose

Es ist bereits allgemein akzeptiert, dass oxidativer Stress in die Pathophysiologie der Endometriose involviert ist, indem dieser eine inflammatorische Reaktion in der Peritoneal Höhle verursacht (63-65). *In-vivo* und *vitro* Studien von Lousse et. al 2012 zeigten auf, dass es bei Frauen mit Endometriose durch Eisenüberladung zu einer Produktion von ROS kommt, die wiederum zu einem Anstieg von *NF-kappa B* in peritonealen Makrophagen führt, was verglichen zu gesunden Kontrollen proinflammatorisches Wachstum und angiogenetische Faktoren förderte (66). Eine Überproduktion von ROS soll in Endometriose hingegen zur Apoptose führen (183), weshalb äußerlich entstehender oxidativer Stress als Möglichkeit vorgeschlagen wurde, den Prozess des Zelltods der Endometriose einzuleiten (184). In vergangenen Studien wurde die zytotoxische Aktivität des NIPPs auch unter Verwendung von 3D-Zellmodellen auf die Generierung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies, welche oxidativen Stress in den Zellen verursachen und somit auch Wachstumsinhibition und DNA-Schädigung, zurückgeführt (159, 160, 167, 179). Da aufgezeigt wurde, dass Endometriosezellen genau wie in Tumorzellen beobachtet höherem endogenen oxidativen Stress durch Anstieg der ROS Produktion, Änderungen der antioxidativen Mechanismen und einem Abfall der Katalase Spiegel ausgesetzt sind (67), wurde in der durchgeführten Studie angenommen, dass der durch PAM induzierte oxidative Stress ähnliche zytotoxische Effekte haben würde wie in Tumorzellen. Denn es wird angenommen, dass der selektive Effekt der NIPP-Therapie auf Tumorzellen auf die höheren intrazellulären Level von ROS in malignen verglichen zu benignen Zellen zurückzuführen ist (185).

Endometriose wurde bisher in nur drei Studien mit Plasma behandelt (137-139). Nezhad et al. verwendeten neutrales Argon Plasma zur laparoskopischen Behandlung im Becken gelegener Endometriose bei 18 Frauen im Rahmen einer klinischen Studie. Die Läsionen wurden unter hoher Temperatur, hohem Gasfluss und 5 mm Abstand mit dem Plasma behandelt oder durch das Plasma herausgeschnitten. Bei einer laparoskopischen Kontrolle 7 Wochen später entdeckte man keine Endometriose mehr an den behandelten Stellen und diese waren frei von Adhäsionen. Die thermischen Effekte des Plasmas machten sich Roman et al. ebenfalls zur Behandlung von Endometriomen zunutze. Die Effekte des Plasmas bezüglich der Behandlung der Endometriose konnten in beiden klinischen Studien zwar deutlich aufgezeigt werden, ließen sich jedoch hauptsächlich auf die thermische Energie des Plasmas zurückführen statt auf die Generierung RONS und Induktion oxidativen Stresses im Gewebe. Deshalb ist die Vergleichbarkeit zu der hier durchgeführten Studie mit durch NIPP generiertes PAM gering. Vergleichbarer ist dahingegen die Studie von Ishida et al., da diese ebenfalls NIPP und mit NIPP aktiviertem DMEM als PAM forschten. Zunächst untersuchten sie die Effekte von PAM auf verschiedene immortalisierte „*endometrial stromal cells* (ESC)“ nämlich ektopische, eutopische mit Endometriose und ohne Endometriose und zusätzlich auf die ISHIKAWA Endometriumkarzinomzelllinie. Die Aktivierungsbedingungen ähnelten den in der eigenen Studie verwendeten mit einem Abstand von 5 mm, 10 mL DMEM, welches in einer 60 mm Petrischale aktiviert wurde und Aktivierungszeiten von 10, 30, 60, 120, 180 s. Die Durchführung der PAM-Behandlung wurde jedoch nicht in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt, wodurch die vollständige Vergleichbarkeit nicht möglich ist. Trotzdem lässt sich sagen, dass der Einfluss des PAMs auf die ISHIKAWA Zelllinie, in diesem Fall repräsentativ für Endometrium Drüsen, und ein schwächerer Effekt auf die immortalisierten Stroma Zellen aufgezeigt wurde. In der eigenen Studie hatte PAM einen stärkeren Einfluss auf die HEC-1A Endometriumkarzinomzelllinie verglichen mit der hESC Zelllinie, jedoch waren die Ergebnisse für beide signifikant. Folglich decken sich die Resultate beider Studien noch bezüglich der PAM-Therapie von 2D-Zellen.

Ishida et al. transplantierten im nächsten Schritt ihrer Studie zerschnittene Teile von uterinem Spendergewebe in zuvor hysterektomierte Mäuse und behandelten diese für 8 Wochen 1-mal wöchentlich mit Östradiol (E₂) subkutan. Vier Wochen nach der Transplantation erfolgte laparoskopisch die 30 s dauernde Irritation der entstandenen Zysten durch NIPP mit einem 10 mm entfernten Plasma Pen. Weitere vier Wochen später wurden die endometriotischen Zysten herausgeschnitten, Formalin-fixiert und immunhistochemisch auf DNA-Schäden und Proliferation analysiert. Die Zysten enthielten glanduläre und Stroma Zellen, wobei sich der oxidative Stress nach NIPP Exposition vor allem in den glandulären Zellen abzeichnete. Die durchschnittliche Fläche der Zysten war bei den NIPP behandelten Mäusen signifikant geringer als bei den unbehandelten Kontrollen. Außerdem zeigte sich eine signifikant gesunkene Expression von Ki67-positiven epithelialen Zellen in NIPP behandelten Zysten verglichen zu Kontrollen. Folglich belegten die Autoren der Studie, dass die NIPP Behandlung das Wachstum der Zysten signifikant hemmte (137). Wie die Endometriosezysten im Mausmodell (137) replizieren die von uns verwendeten aus Patientenproben gewonnenen Endometrioseorganoide ebenfalls die Eigenschaften des Ursprungsepithels, also auch dessen glandulären Anteile, und spiegeln die Diversität der Erkrankung akkurat wieder (151, 186). Die glandulären Anteile der Endometrioseorganoide wurden in Form der Immunfluoreszenz Färbung von Zytokeratin dargestellt (vgl. Abb.8). Demzufolge ähneln sich die beiden 3D-Modelle in ihrer Abbildung der Erkrankung *in-vivo*. Jedoch wurden die Endometriosezysten im Mausmodell anders als in den vorherigen 2D-Versuchen in der Studie nicht mehr mit PAM, sondern direkt mit NIPP behandelt (137), wohingegen in unserem Versuchsaufbau die zuvor in 2D etablierte wirksame PAM-Therapie auf das 3D-Modell übertragen wurde (vgl. Abb.3, 7). Dabei wurde jedoch weder ein signifikanter Einfluss von PAM bezüglich der Wachstumshemmung der Organoide verglichen zu Kontrollen nachgewiesen (vgl. Abb.7), noch wurde in der Immunfluoreszenz ein signifikanter Unterschied bezüglich Ki67-, γ H2AX- und p53-positiver PAM behandelter epithelialer Zellen aufgezeigt (vgl. Abb.8). Die ausbleibenden Effekte verglichen zur Studie von Ishida et al. könnten sich demzufolge am ehesten auf die indirekte

Plasmabehandlung zurückführen lassen. Wie bereits zuvor beschrieben, wird im 3D-Modell eine intensivere Plasmabehandlung benötigt, um ähnliche Effekte zu erzeugen wie im 2D-Modell.

Daher wurde in einigen Studien, in denen 3D-Zellmodelle verwendet wurden, die stärker wirkende direkte Plasmabehandlung als Therapieoption gewählt (159, 160, 167, 179). Die direkte Plasmabehandlung wurde unter Verwendung eines Spheroid-Modells als effektiver bezüglich der Wachstumshemmung der Spheroiden beschrieben. Dies wurde auf die zusätzliche Wirkung der kurzlebigen reaktiven Spezies neben den langlebigen zurückgeführt, da diese nur in der direkten Plasmatherapie eine Rolle spielen (160). Auch in einer weiteren Studie wurde beschrieben, dass die indirekte Plasmabehandlung nur einen schwachen bis keinen Effekt auf das Überleben von Glioblastomzellen im 3D-Spheroid-Modell hatte. Dadurch sei die direkte Behandlung nötig, weil diese eine höhere ROS-Konzentration generiere (179). Andererseits erforschten Hadeji et al., dass die NIPP induzierte Zytotoxizität in Organoiden auch von langlebigen reaktiven Spezies wie Nitrit, Wasserstoffperoxid und Ozon abhängig ist. Zwar wurden Zellen im 3D-Spheroid Modell auch effektiv durch PAM-Behandlung und daraus resultierenden DNA-Schäden in ihrem Wachstum gehemmt (158, 161), jedoch spricht die Diskrepanz zwischen unseren eigenen Ergebnissen und denen vergangener Studien (137) unserer Meinung nach dafür, dass die durch PAM-Therapie generierte RONS Konzentration nicht hoch genug ist, um zur Wachstumsinhibition der Endometriose im Organoid-Modell zu führen.

Stattdessen könnte das erzeugte subletale Niveau an oxidativen Stress sogar den gegenteiligen Effekt erzeugen und Zellproliferation in den Endometrioseorganoiden fördern, was in der Literatur bereits ähnlich beschrieben wurde (187-189).

Die vorliegenden Ergebnisse der mit PAM behandelten aus Patientenproben gewonnenen Endometrioseorganoiden zeigen, dass die Behandlung der Endometriose *in-vivo* mit dem hier generierten PAM keinen therapeutischen Effekt erzielen würde. Jedoch liegen bisher insgesamt kaum Daten zur NIPP-Behandlung von Organoiden und nun zum ersten Mal welche zur PAM-Behandlung von aus Patientenproben gewonnenen Endometrioseorganoiden

vor. Daher ist die Durchführung weiterer Studien mit aus Patientenproben gewonnenen Endometrioseorganoiden nötig, um die Behandlung mit NIPP final als Therapieoption zu bewerten. Hierfür sollte im Hinblick auf die Literatur (137, 159, 160, 167, 179) und die Ergebnisse der vorliegenden Studie vor allem die direkte NIPP-Behandlung der Endometrioseorganoide in Betracht gezogen werden.

4.3.2. Zelltyp- und Dignitäts-spezifische Selektivität von NIPP

Neben der möglichen Limitation der PAM-Therapie verglichen zu einer direkten NIPP-Behandlung als Ursache für die ausbleibenden Effekte auf die Endometrioseorganoide, gilt es außerdem Zelltyp- und Dignitäts-spezifische Selektivität von NIPP als Erklärung in Betracht zu ziehen. Denn in dieser Studie konnten mit denselben Bedingungen der Plasmagenerierung im 3D-Zellmodell signifikante Effekte auf Endometriumkarzinomzellen nachgewiesen werden. Wohingegen die PAM-Behandlung keine Auswirkungen auf die Endometrioseorganoide hatte (vgl. Abb.7-10).

Diese Selektivität wird in der Literatur zum Teil durch eine schlechtere antioxidative Kapazität von Tumorzellen verglichen zu gesunden erklärt (105, 106). Es wurde gezeigt, dass Tumorzellen grundsätzlich höherem endogenen oxidativem Stress aufgrund eines Anstieges der ROS-Produktion und gleichzeitig verringerter ROS-Eliminierung ausgesetzt sind. Die verringerte ROS-Eliminierung wird auf niedrigere Katalase-Spiegel zurückgeführt (190, 191). Niedrigere Katalase-Expression auf der Oberfläche von Tumorzellen ermöglicht RONS wie Wasserstoffperoxid, generiert durch PAM, durch Aquaporine die Akkumulation in die Zelle, wo diese die Ausschöpfung von Glutathion und anschließende Induktion von Apoptose der Tumorzelle bewirken (192). Da jedoch in Endometriosezellen dieselben Veränderungen bezüglich der antioxidativen Kapazität wie in Tumorzellen beschrieben wurden (67), begründet diese Ursache der Selektivität von PAM nicht die ausbleibenden Effekte auf Endometriose in dieser Studie.

Als eine weitere Begründung der Dignitäts-spezifischen Effekte von NIPP-Therapien wird die verstärkte Expression von Aquaporinen in Zellmembranen

von Tumorzellen beschrieben. Dies führt zu einer schnelleren Aufnahme von Wasserstoffperoxid in die Tumorzellen, wodurch diese anfälliger gegenüber NIPP-Therapien verglichen zu benignen Zellen sind (193). Die niedrigere Expression von Cholesterol in der Membran von Tumorzellen verglichen zu benignen Zellen konnte ebenfalls als signifikante Ursache der schnelleren RONS Aufnahme in Tumorzellen aufgezeigt werden (194).

Neben den Auswirkungen der veränderten Expression von Zellmembranbestandteilen in benignen und malignen Zellen stellt die Proliferationsaktivität einen fundamentalen Unterschied dar. Während die Proliferation in benignen Zellen reguliert verläuft, unterliegen maligne Zellen diesem Kontrollsystem nicht mehr und proliferieren ungehemmt weiter (195). Daher sollte ebenfalls in Betracht gezogen werden, dass die verstärkte PAM-Sensitivität gegenüber Tumorzellen auf deren veränderte Proliferationsaktivität und Apoptose-Inhibition zurückzuführen sein könnte (195).

Zwar wird die schlechtere oxidative Kapazität der Tumorzellen meist als Hauptursache der Selektivität von NIPP angesehen (193), doch aufgrund der ähnlichen oxidativen Eigenschaften von Endometriosezellen (67) sollten eher die weiteren möglichen Ursachen in Betracht gezogen werden.

Insgesamt gilt es jedoch zu beachten, dass die Selektivität von PAM gegenüber malignen Zellen nach wie vor Bestandteil der Forschung ist. Daher könnten zwar in dieser Studie geringere Cholesterol- und erhöhte Aquaporin-Expression in der Zellmembran von den Endometriumkarzinom-Zelllinien und deren stärkere Proliferationsaktivität zu der Effektivität der PAM-Behandlung in 2D und 3D beigetragen haben. Mit Sicherheit lässt sich jedoch nicht sagen, dass diese möglichen Zelltyp- und Dignitäts-spezifischen Eigenschaften die Erklärung für den ausbleibenden Effekt der PAM-Behandlung auf die Endometrioseorganoide darstellen.

4.4. Weiterzuführende Schritte

Die geschilderten Ergebnisse der Forschungsarbeit betonen die Notwendigkeit weiterführender Schritte bezüglich der Forschung an den Effekten von NIPP bzw. PAM auf Endometriose und Endometriumkarzinom in 3D-Modellen. Zunächst

sollte aufgrund der ausbleibenden zytotoxischen Effekte des hier generierten PAMs auf aus Patientenproben gewonnene Endometrioseorganoide in Erwägung gezogen werden, diese in einer nachfolgenden Studie direkt mit NIPP zu behandeln. Dadurch könnte ein stärkerer Effekt der Behandlung erzielt werden, welcher eine Remission des Wachstums der aus Patientenproben gewonnenen Endometrioseorganoide zur Folge haben könnte. Für diese Annahme sprechen die Erfolge der direkten NIPP-Therapie auf Organoide und Spheroide (159, 160, 167, 179), aber vor allem die signifikante Remission von Endometrioseherden im Mausmodell nach direkter NIPP-Exposition (137). Gleichzeitig sollten die möglichen Ursachen der Zell- und Dignitäts-spezifischen Selektivität von NIPP bezogen auf Endometriosezellen weiterführend evaluiert werden. Da diese begründen könnten, weshalb sich die PAM-Behandlung im 3D-Zellmodell bei Endometriumkarzinomzellen als effektiv erwies und bei Endometriosezellen nicht.

Das Wachstum der aus den Endometriumkarzinomzelllinien HEC-1A und ISHIKAWA kultivierten Organoide konnte durch die PAM-Behandlung signifikant gehemmt werden. In nachfolgenden Schritten gilt es, die auf molekularer Ebene induzierten Effekte der PAM-Therapie auf die HEC-1A- und ISHIKAWA- Organoide genauer zu analysieren. Zudem werden aus Patientenproben gewonnene Endometriumkarzinomorganoide kultiviert und ebenfalls unter den etablierten Bedingungen mit PAM therapiert. Somit wird die Möglichkeit einer Behandlung des Endometriumkarzinoms mit durch NIPP generiertes PAM zukünftig weitergehend evaluiert.

5 Zusammenfassung

Endometriose ist eine benigne, entzündliche Erkrankung, die bei Frauen in gebärfähigem Alter zu starken abdominellen Schmerzen, Blutungen und Subfertilität führen kann. Trotz hoher Prävalenz und oft starken subjektivem Leidensdruck der Patientinnen existiert neben invasiven Operationen bisher kein kurativer Therapieansatz.

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der Wirkung Plasma aktivierten Mediums (PAM) auf aus Patientenproben gewonnene Endometrioseherde unter Verwendung des 3D Organoidmodells *in-vitro*. Vorbereitend wurden zunächst die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1A und Endometriumstromazelllinie hESC mit verschiedenen wirksamen Aktivierungszeiten und Konzentrationen des PAMs unter Optimierung der Generierungsbedingungen behandelt. PAM induzierte in diesen 2D-Zellmodellen einen Zellwachstumsarrest, Apoptose und DNA-Doppelstrangbrüche, welche man mit dem *Crystal Violet staining Assay* und Immunfluoreszenz nachwies.

Nach Charakterisierung Apoptose-induzierender PAM-Parameter im 2D-Zellmodell wurden die Endometrioseorganoiden als zusätzliche vorbereitende Maßnahme in optimierten Organoidmedium (OM) kultiviert, um die antioxidativ wirksamen Effekte der Inhalte des Standardmediums (SM) für Organoiden auszuschließen.

Die aus den 2D-Experimenten übernommenen PAM-Parameter bewirkten bei den Endometrioseorganoiden keine Wachstumsinhibition. Sowohl eine Verlängerung der Aktivierungs- und Inkubationszeit des PAMs als auch eine Behandlung der Organoid-bildenden Einzelzellen vor dem Aussäen im Matrigel führte zu keinem Einfluss auf das Wachstum der Endometrioseorganoiden. Auf zellulärer Ebene wurden mittels Immunfluoreszenz strukturelle, Proliferationshemmende, Apoptose- und DNA-Doppelstrangbruch-induzierende Wirkungen des PAMs auf Endometrioseorganoiden ausgeschlossen.

Da die Möglichkeit einer Gewebe-unabhängigen, generellen Limitation der Wirkung des PAMs im 3D-Zellmodell bestand, wurden daraufhin die bereits zuvor verwendete Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1A und außerdem ISHIKAWA als Organoiden kultiviert und mit PAM behandelt. Die PAM-Behandlung induzierte

in Endometriumkarzinomzelllinien im Organoidmodell Apoptose und hatte somit einen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität der Organoide. Dabei wurden wirksamkeitshemmende Einflüsse des OM auf die PAM-Wirkung, verglichen mit dem ebenfalls zur Kultur verwendeten DMEM FCS (10%), ausgeschlossen. Zusammenfassend erzielte PAM keine nachweisbaren wachstumshemmenden Effekte auf Endometrioseorganoide.

Bestätigt, 22.05.2024
M. Weiss (Doktorvater)

6 Literaturverzeichnis

1. Laganà AS, Garzon S, Gotte M, Viganò P, Franchi M, Ghezzi F, et al. The Pathogenesis of Endometriosis: Molecular and Cell Biology Insights. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22).
2. Clement PB. The pathology of endometriosis: a survey of the many faces of a common disease emphasizing diagnostic pitfalls and unusual and newly appreciated aspects. *Adv Anat Pathol.* 2007;14(4):241-60.
3. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet.* 2004;364(9447):1789-99.
4. Wang Y, Nicholes K, Shih IM. The Origin and Pathogenesis of Endometriosis. *Annu Rev Pathol.* 2020;15:71-95.
5. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2012;98(3):511-9.
6. Kinkel K, Frei KA, Balleyguier C, Chapron C. Diagnosis of endometriosis with imaging: a review. *European Radiology.* 2006;16(2):285-98.
7. Bazot M, Darai E, Hourani R, Thomassin I, Cortez A, Uzan S, et al. Deep pelvic endometriosis: MR imaging for diagnosis and prediction of extension of disease. *Radiology.* 2004;232(2):379-89.
8. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(5):261-75.
9. Falcone T, Flyckt R. Clinical Management of Endometriosis. *Obstet Gynecol.* 2018;131(3):557-71.
10. Laganà AS, Vitale SG, Salmeri FM, Triolo O, Ban Frangež H, Vrtačnik-Bokal E, et al. Unus pro omnibus, omnes pro uno: A novel, evidence-based, unifying theory for the pathogenesis of endometriosis. *Med Hypotheses.* 2017;103:10-20.
11. Laganà AS, La Rosa VL, Rapisarda AMC, Valenti G, Sapia F, Chiofalo B, et al. Anxiety and depression in patients with endometriosis: impact and management challenges. *Int J Womens Health.* 2017;9:323-30.
12. Vitale SG, Petrosino B, La Rosa VL, Rapisarda AM, Laganà AS. A Systematic Review of the Association Between Psychiatric Disturbances and Endometriosis. *J Obstet Gynaecol Can.* 2016;38(12):1079-80.
13. Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18(2):177-200.
14. Buck Louis GM, Hediger ML, Peterson CM, Croughan M, Sundaram R, Stanford J, et al. Incidence of endometriosis by study population and diagnostic method: the ENDO study. *Fertil Steril.* 2011;96(2):360-5.
15. Missmer SA, Cramer DW. The epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2003;30(1):1-19, vii.
16. Evers JL. Endometriosis does not exist; all women have endometriosis. *Hum Reprod.* 1994;9(12):2206-9.
17. Hans Evers JL. Is adolescent endometriosis a progressive disease that needs to be diagnosed and treated? *Hum Reprod.* 2013;28(8):2023.
18. Balasch J, Creus M, Fábregues F, Carmona F, Ordi J, Martínez-Román S, et al. Visible and non-visible endometriosis at laparoscopy in fertile and infertile women and in patients with chronic pelvic pain: a prospective study. *Hum Reprod.* 1996;11(2):387-91.

19. Carter JE. Combined hysteroscopic and laparoscopic findings in patients with chronic pelvic pain. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 1994;2(1):43-7.
20. Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(5):261-75.
21. Matalliotakis M, Zervou MI, Matalliotaki C, Rahmioglu N, Koumantakis G, Kalogiannidis I, et al. The role of gene polymorphisms in endometriosis. *Mol Med Rep.* 2017;16(5):5881-6.
22. Garai J, Molnar V, Varga T, Koppan M, Torok A, Bodis J. Endometriosis: harmful survival of an ectopic tissue. *Front Biosci.* 2006;11:595-619.
23. Waldeyer. Die epithelialen Eierstocksgeschwülste, insbesondere die Kystome. *Archiv für Gynäkologie.* 1870;1(2):252-316.
24. van der Linden PJ. Theories on the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod.* 1996;11 Suppl 3:53-65.
25. Lauchlan SC. The secondary Müllerian system. *Obstet Gynecol Surv.* 1972;27(3):133-46.
26. Batt RE, Smith RA, Buck Louis GM, Martin DC, Chapron C, Koninckx PR, et al. Müllerianosis. *Histol Histopathol.* 2007;22(10):1161-6.
27. Levander G, Normann P. The pathogenesis of endometriosis; an experimental study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1955;34(4):366-98.
28. Merrill JA. Endometrial induction of endometriosis across Millipore filters. *Am J Obstet Gynecol.* 1966;94(6):780-90.
29. Javert CT. Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis, including five case reports of endometrial tissue in pelvic lymph nodes. *Cancer.* 1949;2(3):399-410.
30. SAMPSON JA. PERFORATING HEMORRHAGIC (CHOCOLATE) CYSTS OF THE OVARY: THEIR IMPORTANCE AND ESPECIALLY THEIR RELATION TO PELVIC ADENOMAS OF ENDOMETRIAL TYPE ("ADENOMYOMA" OF THE UTERUS, RECTOVAGINAL SEPTUM, SIGMOID, ETC.). *Archives of Surgery.* 1921;3(2):245-323.
31. Sampson JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol.* 1927;3(2):93-110.43.
32. Sampson JA. The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 1940;40(4):549-57.
33. Takahashi K, Nagata H, Kitao M. Clinical usefulness of determination of estradiol level in the menstrual blood for patients with endometriosis. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 1989;41(11):1849-50.
34. Kitawaki J, Noguchi T, Amatsu T, Maeda K, Tsukamoto K, Yamamoto T, et al. Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod.* 1997;57(3):514-9.
35. Noble LS, Simpson ER, Johns A, Bulun SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(1):174-9.
36. Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S, et al. Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in

- endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(12):4474-80.
37. Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM, Putman JM, Johns DA, Hinshelwood MM, et al. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(2):600-6.
38. Bulun SE, Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Zhou J, et al. Role of aromatase in endometrial disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001;79(1-5):19-25.
39. Zhao Y, Gong P, Chen Y, Nwachukwu JC, Srinivasan S, Ko C, et al. Dual suppression of estrogenic and inflammatory activities for targeting of endometriosis. *Sci Transl Med.* 2015;7(271):271ra9.
40. Burns KA, Rodriguez KF, Hewitt SC, Janardhan KS, Young SL, Korach KS. Role of estrogen receptor signaling required for endometriosis-like lesion establishment in a mouse model. *Endocrinology.* 2012;153(8):3960-71.
41. Han SJ, Jung SY, Wu SP, Hawkins SM, Park MJ, Kyo S, et al. Estrogen Receptor β Modulates Apoptosis Complexes and the Inflammasome to Drive the Pathogenesis of Endometriosis. *Cell.* 2015;163(4):960-74.
42. Han SJ, Lee JE, Cho YJ, Park MJ, O'Malley BW. Genomic Function of Estrogen Receptor β in Endometriosis. *Endocrinology.* 2019;160(11):2495-516.
43. Bulun SE, Cheng YH, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E, et al. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;248(1-2):94-103.
44. McKinnon B, Mueller M, Montgomery G. Progesterone Resistance in Endometriosis: an Acquired Property? *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29(8):535-48.
45. Zondervan KT, Becker CM, Koga K, Missmer SA, Taylor RN, Viganò P. Endometriosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4(1):9.
46. Grund EM, Kagan D, Tran CA, Zeitvogel A, Starzinski-Powitz A, Nataraja S, et al. Tumor necrosis factor-alpha regulates inflammatory and mesenchymal responses via mitogen-activated protein kinase kinase, p38, and nuclear factor kappaB in human endometriotic epithelial cells. *Mol Pharmacol.* 2008;73(5):1394-404.
47. Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, Murai JT, Schriock ED, Landers DV, et al. Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(3):1118-22.
48. Wu MH, Wang CA, Lin CC, Chen LC, Chang WC, Tsai SJ. Distinct regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1beta in normal and endometriotic stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(1):286-95.
49. Han SJ, Hawkins SM, Begum K, Jung SY, Kovanci E, Qin J, et al. A new isoform of steroid receptor coactivator-1 is crucial for pathogenic progression of endometriosis. *Nat Med.* 2012;18(7):1102-11.
50. Tsai SJ, Wu MH, Lin CC, Sun HS, Chen HM. Regulation of steroidogenic acute regulatory protein expression and progesterone production in endometriotic stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(12):5765-73.
51. Bulun SE, Monsavais D, Pavone ME, Dyson M, Xue Q, Attar E, et al. Role of estrogen receptor- β in endometriosis. *Semin Reprod Med.* 2012;30(1):39-45.

52. Sun HS, Hsiao KY, Hsu CC, Wu MH, Tsai SJ. Transactivation of steroidogenic acute regulatory protein in human endometriotic stromal cells is mediated by the prostaglandin EP2 receptor. *Endocrinology*. 2003;144(9):3934-42.
53. Anglesio MS, Papadopoulos N, Ayhan A, Nazeran TM, Noë M, Horlings HM, et al. Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. *N Engl J Med*. 2017;376(19):1835-48.
54. Suda K, Nakaoka H, Yoshihara K, Ishiguro T, Tamura R, Mori Y, et al. Clonal Expansion and Diversification of Cancer-Associated Mutations in Endometriosis and Normal Endometrium. *Cell Rep*. 2018;24(7):1777-89.
55. Lac V, Verhoef L, Aguirre-Hernandez R, Nazeran TM, Tessier-Cloutier B, Praetorius T, et al. Iatrogenic endometriosis harbors somatic cancer-driver mutations. *Hum Reprod*. 2019;34(1):69-78.
56. Anglesio MS, Bashashati A, Wang YK, Senz J, Ha G, Yang W, et al. Multifocal endometriotic lesions associated with cancer are clonal and carry a high mutation burden. *J Pathol*. 2015;236(2):201-9.
57. Chui MH, Wang TL, Shih IM. Endometriosis: benign, malignant, or something in between? *Oncotarget*. 2017;8(45):78263-4.
58. Wilbur MA, Shih IM, Segars JH, Fader AN. Cancer Implications for Patients with Endometriosis. *Semin Reprod Med*. 2017;35(1):110-6.
59. Xue Q, Lin Z, Cheng YH, Huang CC, Marsh E, Yin P, et al. Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis. *Biol Reprod*. 2007;77(4):681-7.
60. Wu Y, Halverson G, Basir Z, Strawn E, Yan P, Guo SW. Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193(2):371-80.
61. Xue Q, Lin Z, Yin P, Milad MP, Cheng YH, Confino E, et al. Transcriptional activation of steroidogenic factor-1 by hypomethylation of the 5' CpG island in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(8):3261-7.
62. Izawa M, Taniguchi F, Terakawa N, Harada T. Epigenetic aberration of gene expression in endometriosis. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013;5(3):900-10.
63. Christodoulakos G, Augoulea A, Lambrinoudaki I, Sioulas V, Creatsas G. Pathogenesis of endometriosis: the role of defective 'immunosurveillance'. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care*. 2007;12(3):194-202.
64. Augoulea A, Mastorakos G, Lambrinoudaki I, Christodoulakos G, Creatsas G. The role of the oxidative-stress in the endometriosis-related infertility. *Gynecological Endocrinology*. 2009;25(2):75-81.
65. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology*. 2005;3:1-21.
66. Lousse J-C, Van Langendonck A, Defrere S, Ramos RG, Colette S, Donnez J. Peritoneal endometriosis is an inflammatory disease. *Frontiers in Bioscience-Elite*. 2012;4(1):23-40.
67. Ngô C, Chéreau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *The American Journal of Pathology*. 2009;175(1):225-34.

68. Barbieri RL. Hormone treatment of endometriosis: The estrogen threshold hypothesis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1992;166(2):740-5.
69. Guo S-W. Recurrence of endometriosis and its control. *Human Reproduction Update*. 2009;15(4):441-61.
70. Shakiba K, Bena JF, McGill KM, Minger J, Falcone T. Surgical Treatment of Endometriosis: A 7-Year Follow-up on the Requirement for Further Surgery. *Obstetrics & Gynecology*. 2008;111(6):1285-92.
71. Leyland N, Casper R, Laberge P, Singh SS, Allen L, Arendas K, et al. Endometriosis: Diagnosis and Management. *Journal of Endometriosis*. 2010;2(3):107-34.
72. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis: a committee opinion. *Fertility and Sterility*. 2014;101(4):927-35.
73. Dunselman GAJ, Vermeulen N, Becker C, Calhaz-Jorge C, D'Hooghe T, De Bie B, et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis †. *Human Reproduction*. 2014;29(3):400-12.
74. Raffi F, Metwally M, Amer S. The Impact of Excision of Ovarian Endometrioma on Ovarian Reserve: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012;97(9):3146-54.
75. Bedaiwy MA, Alfaraj S, Yong P, Casper R. New developments in the medical treatment of endometriosis. *Fertility and Sterility*. 2017;107(3):555-65.
76. Arndt S, Wacker E, Li YF, Shimizu T, Thomas HM, Morfill GE, et al. Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. *Exp Dermatol*. 2013;22(4):284-9.
77. Koritzer J, Boxhammer V, Schafer A, Shimizu T, Klampfl TG, Li YF, et al. Restoration of sensitivity in chemo-resistant glioma cells by cold atmospheric plasma. *PLoS One*. 2013;8(5):e64498.
78. Koensgen D, Besic I, Gumbel D, Kaul A, Weiss M, Diesing K, et al. Cold Atmospheric Plasma (CAP) and CAP-Stimulated Cell Culture Media Suppress Ovarian Cancer Cell Growth - A Putative Treatment Option in Ovarian Cancer Therapy. *Anticancer Res*. 2017;37(12):6739-44.
79. Weiss M, Gumbel D, Gelbrich N, Brandenburg LO, Mandelkow R, Zimmermann U, et al. Inhibition of Cell Growth of the Prostate Cancer Cell Model LNCaP by Cold Atmospheric Plasma. *In Vivo*. 2015;29(5):611-6.
80. Partecke LI, Evert K, Haugk J, Doering F, Normann L, Diedrich S, et al. Tissue tolerable plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *BMC Cancer*. 2012;12:473.
81. Wenzel T, Carvajal Berrio DA, Reisenauer C, Layland S, Koch A, Wallwiener D, et al. Trans-Mucosal Efficacy of Non-Thermal Plasma Treatment on Cervical Cancer Tissue and Human Cervix Uteri by a Next Generation Electrosurgical Argon Plasma Device. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2).
82. Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. Applied plasma medicine. *Plasma Process Polym*. 2008;5(6):503-33.
83. Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, van Dijk J, et al. Plasma medicine: an introductory review. *New J Phys*. 2009;11.
84. Okazaki S, Kogoma M, Uehara M, Kimura Y. Appearance of Stable Glow-Discharge in Air, Argon, Oxygen and Nitrogen at Atmospheric-Pressure Using a 50-Hz Source. *J Phys D Appl Phys*. 1993;26(5):889-92.

85. Weiss M, Gumbel D, Hanschmann EM, Mandelkow R, Gelbrich N, Zimmermann U, et al. Cold Atmospheric Plasma Treatment Induces Anti-Proliferative Effects in Prostate Cancer Cells by Redox and Apoptotic Signaling Pathways. *PLoS One*. 2015;10(7):e0130350.
86. Laroussi M, Akan T. Arc-free atmospheric pressure cold plasma jets: A review. *Plasma Process Polym*. 2007;4(9):777-88.
87. Weltmann KD, Kindel E, von Woedtke T, Hähnel M, Stieber M, Brandenburg R. Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. *Pure and Applied Chemistry*. 2010;82(6):1223-37.
88. Jeong J, Babayan S, Tu V, Park J, Henins I, Hicks R, et al. Etching materials with an atmospheric-pressure plasma jet. *Plasma Sources Science and Technology*. 1998;7(3):282.
89. Kogelschatz U. Dielectric-barrier discharges: their history, discharge physics, and industrial applications. *Plasma Chem Plasma P*. 2003;23(1):1-46.
90. Wagner H-E, Brandenburg R, Kozlov K, Sonnenfeld A, Michel P, Behnke J. The barrier discharge: basic properties and applications to surface treatment. *Vacuum*. 2003;71(3):417-36.
91. Arjunan KP, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma induces angiogenesis through reactive oxygen species. *J R Soc Interface*. 2012;9(66):147-57.
92. Yan D, Sherman JH, Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget*. 2017;8(9):15977-95.
93. Vandamme M, Robert E, Dozias S, Sobilo J, Lerondel S, Le Pape A, et al. Response of human glioma U87 xenografted on mice to non thermal plasma treatment. *Plasma medicine*. 2011;1(1).
94. Cheng X, Sherman J, Murphy W, Ratovitski E, Canady J, Keidar M. The effect of tuning cold plasma composition on glioblastoma cell viability. *PLoS One*. 2014;9(5):e98652.
95. Ja Kim S, Min Joh H, Chung TH. Production of intracellular reactive oxygen species and change of cell viability induced by atmospheric pressure plasma in normal and cancer cells. *Appl Phys Lett*. 2013;103(15):153705.
96. Zhao S, Xiong Z, Mao X, Meng D, Lei Q, Li Y, et al. Atmospheric pressure room temperature plasma jets facilitate oxidative and nitrate stress and lead to endoplasmic reticulum stress dependent apoptosis in HepG2 cells. *PLoS One*. 2013;8(8):e73665.
97. Vandamme M, Robert E, Lerondel S, Sarron V, Ries D, Dozias S, et al. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *Int J Cancer*. 2012;130(9):2185-94.
98. Lu X, Naidis GV, Laroussi M, Reuter S, Graves DB, Ostrikov K. Reactive species in non-equilibrium atmospheric-pressure plasmas: Generation, transport, and biological effects. *Phys Rep*. 2016;630:1-84.
99. Keidar M, Shashurin A, Volotskova O, Stepp MA, Srinivasan P, Sandler A, et al. Cold atmospheric plasma in cancer therapy. *Phys Plasmas*. 2013;20(5).
100. Bauer G, Sersenova D, Graves DB, Machala Z. Cold Atmospheric Plasma and Plasma-Activated Medium Trigger RONS-Based Tumor Cell Apoptosis. *Sci Rep*. 2019;9(1):14210.

101. S. Mohades ML, J. Sears, N. Barekzi, and H. Razavi. Evaluation of the effects of a plasma activated medium on cancer cells. *Physics of Plasmas* 22, 122001. 2015.
102. Ikeda JI, Tanaka H, Ishikawa K, Sakakita H, Ikehara Y, Hori M. Plasma-activated medium (PAM) kills human cancer-initiating cells. *Pathol Int.* 2018;68(1):23-30.
103. Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PLoS One.* 2011;6(1):e16270.
104. Sun Y, Lu Y, Saredy J, Wang X, Drummer Iv C, Shao Y, et al. ROS systems are a new integrated network for sensing homeostasis and alarming stresses in organelle metabolic processes. *Redox Biol.* 2020;37:101696.
105. Gay-Mimbrera J, Garcia MC, Isla-Tejera B, Rodero-Serrano A, Garcia-Nieto AV, Ruano J. Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. *Adv Ther.* 2016;33(6):894-909.
106. Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer.* 2010;1805(1):53-71.
107. Bernhardt T, Semmler ML, Schäfer M, Bekeschus S, Emmert S, Boeckmann L. Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:3873928.
108. Xiong Z. *Plasma Medicine—Concepts and Clinical Applications.* Volume; 2018.
109. Wende K, von Woedtke T, Weltmann KD, Bekeschus S. Chemistry and biochemistry of cold physical plasma derived reactive species in liquids. *Biol Chem.* 2018;400(1):19-38.
110. Biscop E, Lin A, Boxem WV, Loenhout JV, Backer J, Deben C, et al. Influence of Cell Type and Culture Medium on Determining Cancer Selectivity of Cold Atmospheric Plasma Treatment. *Cancers (Basel).* 2019;11(9).
111. Kaushik NK, Ghimire B, Li Y, Adhikari M, Veerana M, Kaushik N, et al. Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions. *Biol Chem.* 2018;400(1):39-62.
112. Brisset JL, Pawlat J. Chemical Effects of Air Plasma Species on Aqueous Solutes in Direct and Delayed Exposure Modes: Discharge, Post-discharge and Plasma Activated Water. *Plasma Chem Plasma P.* 2016;36(2):355-81.
113. Naitali M, Kamgang-Youbi G, Herry JM, Bellon-Fontaine MN, Brisset JL. Combined effects of long-living chemical species during microbial inactivation using atmospheric plasma-treated water. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(22):7662-4.
114. Verlackt CCW, Van Boxem W, Bogaerts A. Transport and accumulation of plasma generated species in aqueous solution. *Phys Chem Chem Phys.* 2018;20(10):6845-59.
115. Brany D, Dvorska D, Halasova E, Skovierova H. Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8).
116. Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Takeda K, Nakamura K, Utsumi F, et al. Plasma Medical Science for Cancer Therapy: Toward Cancer Therapy Using

Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma. Ieee T Plasma Sci. 2014;42(12):3760-4.

117. Yan DY, Sherman JH, Cheng XQ, Ratovitski E, Canady J, Keidar M. Controlling plasma stimulated media in cancer treatment application. *Appl Phys Lett*. 2014;105(22).

118. Tanaka H, Mizuno M, Kikkawa F, Hori M. Plasma-Activated Medium and Its Medical and Biological Applications. 2016 43rd Ieee International Conference on Plasma Science (Icops). 2016.

119. Adachi T, Tanaka H, Nonomura S, Hara H, Kondo S, Hod M. Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial-nuclear network. *Free Radical Bio Med*. 2015;79:28-44.

120. Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, et al. Effect of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma on Anti-Proliferative Activity against Chronic Chemo-Resistant Ovarian Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Plos One*. 2013;8(12).

121. Stratmann B, Costea TC, Nolte C, Hiller J, Schmidt J, Reindel J, et al. Effect of Cold Atmospheric Plasma Therapy vs Standard Therapy Placebo on Wound Healing in Patients With Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open*. 2020;3(7):e2010411.

122. Sardella E, Mola MG, Gristina R, Piccione M, Veronico V, Bellis M, et al. A Synergistic Effect of Reactive Oxygen and Reactive Nitrogen Species in Plasma Activated Liquid Media Triggers Astrocyte Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9).

123. Guo L, Xu R, Gou L, Liu Z, Zhao Y, Liu D, et al. Mechanism of Virus Inactivation by Cold Atmospheric-Pressure Plasma and Plasma-Activated Water. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84(17).

124. Sun T, Yu S, Song X, Zhang J, Bao Q, Mei Q, et al. Cold Plasma Irradiation Regulates Inflammation and Oxidative Stress in Human Bronchial Epithelial Cells and Human Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Radiat Res*. 2022;197(2):166-74.

125. Ahn HJ, Kim KI, Kim G, Moon E, Yang SS, Lee JS. Atmospheric-pressure plasma jet induces apoptosis involving mitochondria via generation of free radicals. *PLoS One*. 2011;6(11):e28154.

126. Isbary G, Morfill G, Schmidt HU, Georgi M, Ramrath K, Heinlin J, et al. A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *Br J Dermatol*. 2010;163(1):78-82.

127. Isbary G, Heinlin J, Shimizu T, Zimmermann JL, Morfill G, Schmidt HU, et al. Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial. *Br J Dermatol*. 2012;167(2):404-10.

128. Brehmer F, Haenssle HA, Daeschlein G, Ahmed R, Pfeiffer S, Gorlitz A, et al. Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm((R)) VU-2010): results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(1):148-55.

129. Chuangsuwanich A, Assadamongkol T, Boonyawan D. The Healing Effect of Low-Temperature Atmospheric-Pressure Plasma in Pressure Ulcer: A Randomized Controlled Trial. *Int J Low Extrem Wounds*. 2016;15(4):313-9.
130. Chatraie M, Torkaman G, Khani M, Salehi H, Shokri B. In vivo study of non-invasive effects of non-thermal plasma in pressure ulcer treatment. *Sci Rep*. 2018;8(1):5621.
131. Gao J, Wang L, Xia C, Yang X, Cao Z, Zheng L, et al. Cold atmospheric plasma promotes different types of superficial skin erosion wounds healing. *Int Wound J*. 2019;16(5):1103-11.
132. Mokhtari H, Farahmand L, Yaserian K, Jalili N, Majidzadeh AK. The antiproliferative effects of cold atmospheric plasma-activated media on different cancer cell lines, the implication of ozone as a possible underlying mechanism. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):6778-82.
133. Iseki S, Nakamura K, Hayashi M, Tanaka H, Kondo H, Kajiyama H, et al. Selective killing of ovarian cancer cells through induction of apoptosis by nonequilibrium atmospheric pressure plasma. *Appl Phys Lett*. 2012;100(11).
134. Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Hori M, Kikkawa F. Selective cytotoxicity of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma against ovarian clear-cell carcinoma. *Springerplus*. 2014;3.
135. Kim SJ, Chung TH, Bae SH, Leem SH. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by a pulsed atmospheric pressure plasma jet. *Appl Phys Lett*. 2010;97(2).
136. Henes M, Bosmuller H, Neis F, Wallwiener D, Brucker S, Weiss M. Non-invasive-physical-plasma treatment of low- and high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a non-invasive and anaesthesia-independent treatment procedure evaluated in a prospective, monocentric clinical trial. *Geburtsh Frauenheilk*. 2020;80(10):E211-E.
137. Ishida C, Mori M, Nakamura K, Tanaka H, Mizuno M, Hori M, et al. Non-thermal plasma prevents progression of endometriosis in mice. *Free Radical Research*. 2016;50(10):1131-9.
138. Roman H, Auber M, Mokdad C, Martin C, Diguët A, Marpeau L, et al. Ovarian endometrioma ablation using plasma energy versus cystectomy: a step toward better preservation of the ovarian parenchyma in women wishing to conceive. *Fertility and Sterility*. 2011;96(6):1396-400.
139. Nezhat C, Kho KA, Morozov V. Use of neutral argon plasma in the laparoscopic treatment of endometriosis. *Jsls*. 2009;13(4):479-83.
140. Kobayashi A, Behringer RR. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat Rev Genet*. 2003;4(12):969-80.
141. Roy A, Matzuk MM. Reproductive tract function and dysfunction in women. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(9):517-25.
142. Hart RJ. Physiological Aspects of Female Fertility: Role of the Environment, Modern Lifestyle, and Genetics. *Physiol Rev*. 2016;96(3):873-909.
143. Hibaoui Y, Feki A. Organoid Models of Human Endometrial Development and Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:84.
144. Urlick ME, Bell DW. Clinical actionability of molecular targets in endometrial cancer. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(9):510-21.

145. Lortet-Tieulent J, Ferlay J, Bray F, Jemal A. International Patterns and Trends in Endometrial Cancer Incidence, 1978-2013. *J Natl Cancer Inst.* 2018;110(4):354-61.
146. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009;459(7244):262-5.
147. van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell.* 2015;161(4):933-45.
148. Yao Y, Xu X, Yang L, Zhu J, Wan J, Shen L, et al. Patient-Derived Organoids Predict Chemoradiation Responses of Locally Advanced Rectal Cancer. *Cell Stem Cell.* 2020;26(1):17-26.e6.
149. Tuveson D, Clevers H. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science.* 2019;364(6444):952-5.
150. Driehuis E, Kretzschmar K, Clevers H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications. *Nat Protoc.* 2020;15(10):3380-409.
151. Boretto M, Cox B, Noben M, Hendriks N, Fassbender A, Roose H, et al. Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability. *Development.* 2017;144(10):1775-86.
152. Turco MY, Gardner L, Hughes J, Cindrova-Davies T, Gomez MJ, Farrell L, et al. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nat Cell Biol.* 2017;19(5):568-77.
153. Matteo Boretto NM, Xinlong Luo, Aurélie Hennes, Bram Boeckx, Bich Bui, Ruben Heremans, Lisa Perneel, Hiroto Kobayashi, Indra Van Zundert, Hilde Brems, Benoit Cox, Marc Ferrante, Hiroshi Uji-i, Kian Peng Koh, Thomas D'Hooghe, Arne Vanhie, Ignace Vergote, Christel Meuleman, Carla Tomassetti, Diether Lambrechts, Joris Vriens, Dirk Timmerman & Hugo Vankelecom. Patient-derived organoids from endometrial disease capture clinical heterogeneity and are amenable to drug screening. *Nature Cell Biology.* 2019.
154. Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med.* 2007;25(6):445-53.
155. Peterse D, Clercq K, Goossens C, Binda MM, F OD, Saunders P, et al. Optimization of Endometrial Decidualization in the Menstruating Mouse Model for Preclinical Endometriosis Research. *Reprod Sci.* 2018;25(11):1577-88.
156. Mannelli C, Ietta F, Avanzati AM, Skarzynski D, Paulesu L. Biological Tools to Study the Effects of Environmental Contaminants at the Feto-Maternal Interface. *Dose Response.* 2015;13(4):1559325815611902.
157. Bekeschus S, Liebelt G, Menz J, Berner J, Sagwal SK, Wende K, et al. Tumor cell metabolism correlates with resistance to gas plasma treatment: The evaluation of three dogmas. *Free Radic Biol Med.* 2021;167:12-28.
158. Judée F, Fongia C, Ducommun B, Yousfi M, Lobjois V, Merbahi N. Short and long time effects of low temperature Plasma Activated Media on 3D multicellular tumor spheroids. *Sci Rep.* 2016;6:21421.

159. Plewa J-M, Yousfi M, Frongia C, Eichwald O, Ducommun B, Merbahi N, et al. Low-temperature plasma-induced antiproliferative effects on multi-cellular tumor spheroids. *New J Phys.* 2014;16(4):043027.
160. Privat-Maldonado A, Gorbanev Y, Dewilde S, Smits E, Bogaerts A. Reduction of Human Glioblastoma Spheroids Using Cold Atmospheric Plasma: The Combined Effect of Short- and Long-Lived Reactive Species. *Cancers (Basel).* 2018;10(11).
161. Chauvin J, Judee F, Merbahi N, Vicendo P. Effects of Plasma Activated Medium on Head and Neck FaDu Cancerous Cells: Comparison of 3D and 2D Response. *Anticancer Agents Med Chem.* 2018;18(6):776-83.
162. Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia.* 2015;17(1):1-15.
163. Durand RE, Olive PL. Resistance of tumor cells to chemo-and radiotherapy modulated by the three-dimensional architecture of solid tumors and spheroids. *Methods in cell biology.* 2001;64:211-33.
164. Zanoni M, Cortesi M, Zamagni A, Arienti C, Pignatta S, Tesei A. Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *Journal of Hematology & Oncology.* 2020;13(1):97.
165. Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nature Reviews Cancer.* 2018;18(7):407-18.
166. Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell.* 2016;165(7):1586-97.
167. Hadeifi A, Leprovots M, Thulliez M, Bastin O, Lefort A, Libert F, et al. Cold atmospheric plasma differentially affects cell renewal and differentiation of stem cells and APC-deficient-derived tumor cells in intestinal organoids. *Cell Death Discov.* 2022;8(1):66.
168. Wenzel T, Berrio DAC, Daum R, Reisenauer C, Weltmann KD, Wallwiener D, et al. Molecular Effects and Tissue Penetration Depth of Physical Plasma in Human Mucosa Analyzed by Contact- and Marker-Independent Raman Microspectroscopy. *Acs Appl Mater Inter.* 2019;11(46):42885-95.
169. Holl M, Rasch ML, Becker L, Keller AL, Schultze-Rhonhof L, Ruoff F, et al. Cell Type-Specific Anti-Adhesion Properties of Peritoneal Cell Treatment with Plasma-Activated Media (PAM). *Biomedicines.* 2022;10(4).
170. Marzi J, Stope MB, Henes M, Koch A, Wenzel T, Holl M, et al. Noninvasive Physical Plasma as Innovative and Tissue-Preserving Therapy for Women Positive for Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Cancers (Basel).* 2022;14(8).
171. Guarino VA, Oldham WM, Loscalzo J, Zhang YY. Reaction rate of pyruvate and hydrogen peroxide: assessing antioxidant capacity of pyruvate under biological conditions. *Sci Rep.* 2019;9(1):19568.
172. Nishi K, Iwaihara Y, Tsunoda T, Doi K, Sakata T, Shirasawa S, et al. ROS-induced cleavage of NHLRC2 by caspase-8 leads to apoptotic cell death in the HCT116 human colon cancer cell line. *Cell Death Dis.* 2017;8(12):3218.
173. Yan D, Talbot A, Nourmohammadi N, Cheng X, Canady J, Sherman J, et al. Principles of using Cold Atmospheric Plasma Stimulated Media for Cancer Treatment. *Sci Rep.* 2015;5:18339.
174. Takeda S, Yamada S, Hattori N, Nakamura K, Tanaka H, Kajiyama H, et al. Intraperitoneal Administration of Plasma-Activated Medium: Proposal of a

Novel Treatment Option for Peritoneal Metastasis From Gastric Cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2017;24(5):1188-94.

175. Ghimire B, Sornsakdanuphap J, Hong YJ, Uhm HS, Weltmann K-D, Choi EH. The effect of the gap distance between an atmospheric-pressure plasma jet nozzle and liquid surface on OH and N₂ species concentrations. *Phys Plasmas*. 2017;24(7):073502.

176. Weiss M, Barz J, Ackermann M, Utz R, Ghoul A, Weltmann KD, et al. Dose-Dependent Tissue-Level Characterization of a Medical Atmospheric Pressure Argon Plasma Jet. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(22):19841-53.

177. Iwase A, Ando H, Nagasaka T, Shibata D, Harata T, Shimomura Y, et al. Neutral endopeptidase expressed by decidualized stromal cells suppresses akt phosphorylation and deoxyribonucleic acid synthesis induced by endothelin-1 in human endometrium. *Endocrinology*. 2006;147(11):5153-9.

178. Kobayashi H, Yamashita Y, Iwase A, Yoshikawa Y, Yasui H, Kawai Y, et al. The ferroimmunomodulatory role of ectopic endometriotic stromal cells in ovarian endometriosis. *Fertil Steril*. 2012;98(2):415-22.e1-12.

179. Van Loenhout J, Freire Bullosa L, Quatannens D, De Waele J, Merlin C, Lambrechts H, et al. Auranofin and Cold Atmospheric Plasma Synergize to Trigger Distinct Cell Death Mechanisms and Immunogenic Responses in Glioblastoma. *Cells*. 2021;10(11).

180. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*. 2015;230(1):16-26.

181. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(10):839-45.

182. Biscop E, Lin A, Van Boxem W, Van Loenhout J, De Backer J, Deben C, et al. The influence of cell type and culture medium on determining cancer selectivity of cold atmospheric plasma treatment. *Cancers*. 2019;11(9):1287.

183. Yamaguchi K, Mandai M, Toyokuni S, Hamanishi J, Higuchi T, Takakura K, et al. Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(1):32-40.

184. Ivanova D, Bakalova R, Lazarova D, Gadjeva V, Zhelev Z. The impact of reactive oxygen species on anticancer therapeutic strategies. *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University*. 2013;22(6):899-908.

185. Semmler ML, Bekeschus S, Schäfer M, Bernhardt T, Fischer T, Witzke K, et al. Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2).

186. Boretto M, Maenhoudt N, Luo X, Hennes A, Boeckx B, Bui B, et al. Patient-derived organoids from endometrial disease capture clinical heterogeneity and are amenable to drug screening. *Nat Cell Biol*. 2019;21(8):1041-51.

187. Toyokuni S. Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrototoxic disease. *Cancer Sci*. 2009;100(1):9-16.

188. Toyokuni S. Iron as a target of chemoprevention for longevity in humans. *Free Radic Res*. 2011;45(8):906-17.

189. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Letters*. 1995;358.

190. Arnold RS, Shi J, Murad E, Whalen AM, Sun CQ, Polavarapu R, et al. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(10):5550-5.
191. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*. 1991;51(3):794-8.
192. Bauer G. The synergistic effect between hydrogen peroxide and nitrite, two long-lived molecular species from cold atmospheric plasma, triggers tumor cells to induce their own cell death. *Redox Biol*. 2019;26:101291.
193. Yan D, Talbot A, Nourmohammadi N, Sherman JH, Cheng X, Keidar M. Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma--a model based on aquaporins (Review). *Biointerphases*. 2015;10(4):040801.
194. Van der Paal J, Verheyen C, Neyts EC, Bogaerts A. Hampering Effect of Cholesterol on the Permeation of Reactive Oxygen Species through Phospholipids Bilayer: Possible Explanation for Plasma Cancer Selectivity. *Scientific Reports*. 2017;7(1):39526.
195. Kajiyama H, Utsumi F, Nakamura K, Tanaka H, Toyokuni S, Hori M, et al. Future perspective of strategic non-thermal plasma therapy for cancer treatment. *J Clin Biochem Nutr*. 2017;60(1):33-8.

7 Erklärung zum Eigenanteil

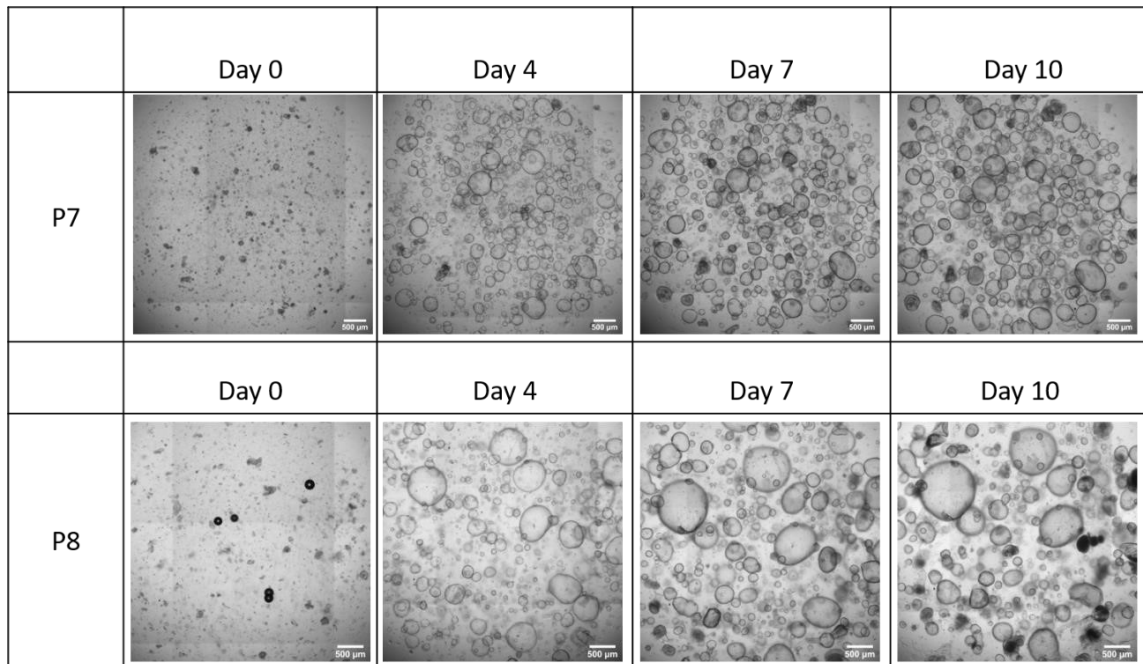
Die Arbeit wurde in der Universitätsfrauenklinik des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Jun.-Prof. Martin Weiss durchgeführt. Die Konzeption der Studie in Zusammenarbeit mit Jun.-Prof. Martin Weiss und Dr. André Koch. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung von Dr. Dr. Sarah Steinmacher und Dr. André Koch von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig.

Das Manuskript wurde von mir selbstständig verfasst und es wurden keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet.

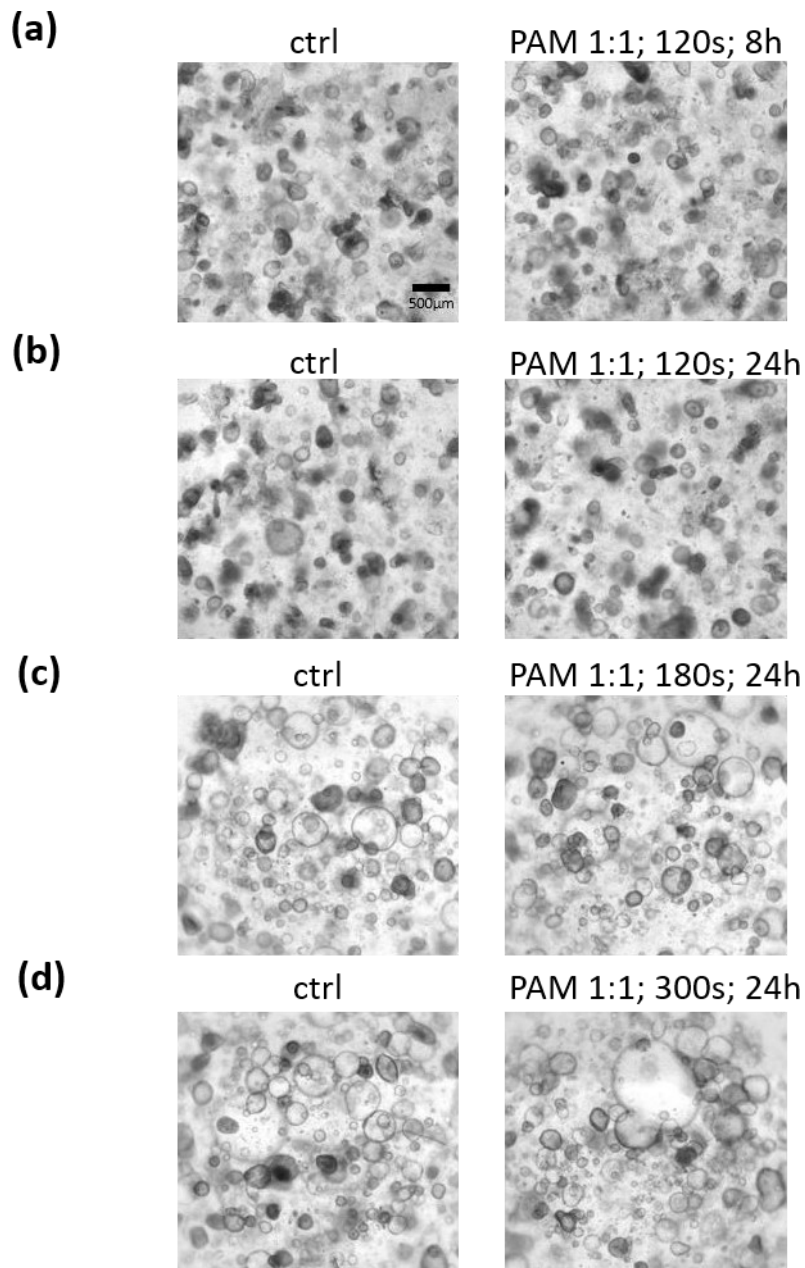
Tübingen, den 20.05.2024

Juliane Scheid

8 Ergänzende Abbildungen



Ergänzende Abbildung 1: Beispielhafte Darstellung der Organoiddokumentation. Abbildung repräsentativer mikroskopischer Phasenkontrastaufnahmen einer Endometrioseorganoidlinie über zwei Passagen jeweils an den Tagen 0, 4, 7 und 10 aufgenommen mit dem EVOS-Mikroskop in 4-facher Vergrößerung.



Ergänzende Abbildung 2 : Behandlung der Endometrioseorganoide mit alternierenden PAM-Parametern. Gegenüberstellung repräsentativer mikroskopischer Phasenkontrastaufnahmen angefertigt mit dem EVOS-Mikroskop in 4-facher Vergrößerung zwischen mit 1:1 PAM behandelten Endometrioseorganoide und unbehandelten Kontrollen am letzten Tag der Passage. (a,b) Abbildung der Organoide nach Behandlung mit 120 s aktiviertem und 8 h (a) und 24 h (b) appliziertem PAM. (c,d) Abbildung der Organoide nach Behandlung mit 180 s (c) und 300 s (d) aktiviertem und 24 h appliziertem PAM. Die Proben wurden jeweils am 2.Tag der Passage mit PAM behandelt.